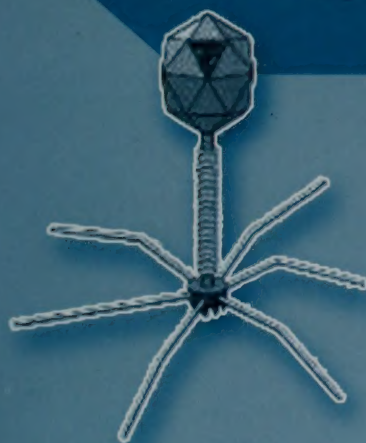


能力培养型生物学基础课系列实验教材

# 遗传学实验教程



郭善利 刘林德 主编

YICHUANXUE  
SHIYAN  
JIAOCHENG



科学出版社

www.sciencep.com



中科院植物所图书馆



S0003890

58.14057  
428

能力培养型生物学基础课系列实验教材

能力培养型生物学基础课系列实验教材编委会

# 遗传学实验教程

郭善利 刘林德 主编

郭善利 刘林德 主编

孙虎山

郭善利

科学出版社

ISBN 7-03-0110-80-1

定价：10.00元

科学出版社

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

科学出版社

北京

元00.01：份宝



## 内 容 简 介

根据遗传学的学科发展和研究水平,本书分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分。第一部分基础性实验,共5章,20个实验;第二部分综合性实验,共13个实验;第三部分研究性实验,共6个实验。本教程附录中列有实验室工作规程、实验室一般溶液的配制、组织和细胞培养常用的培养基、各种染色液的配制、实验常用数据、消毒及灭菌、玻璃器皿的洗涤,为基层工作的同志提供了必需的参考资料。

本教程可供高等院校生物科学专业及农、林、医药院校等相关专业师生使用,也可供中学生物学教师作教学参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程 / 郭善利, 刘林德主编. — 北京: 科学出版社, 2004

能力培养型生物学基础课系列实验教材

ISBN 7-03-014203-9

I. 遗... II. ①郭... ②刘... III. 遗传学-实验-高等学校-教材 IV. Q3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 084865 号

责任编辑: 陈 露 张 臻 / 责任校对: 连秉亮  
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 一 明

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2004年9月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2004年9月第一次印刷 印张: 11  $\frac{3}{4}$

印数: 1—3 200 字数: 225 000

定价: 19.00 元



# 能力培养型生物学基础课系列实验教材编委会

主任委员：安利国（山东师范大学）

副主任委员：刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

郭善利（聊城大学）

委员：（按姓氏笔画为序）

付荣恕（山东师范大学）

艾洪滨（山东师范大学）

刘 箭（山东师范大学）

刘林德（烟台师范学院）

刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

安利国（山东师范大学）

杨 革（曲阜师范大学）

侯福林（山东师范大学）

赵遵田（山东师范大学）

郭善利（聊城大学）

# 《遗传学实验教程》编写人员

主 编：郭善利 刘林德

副主编：周国利 赵建萍 邱奉同

编 者：(按姓氏笔画为序)

王淑芳 刘 文 刘林德 邱奉同

张爱民 周国利 赵建萍 贺继临

姚志刚 郭善利



## 出版说明

生物科学是一门实验性学科,实验教学在其专业课学习中占有十分重要的地位,动手能力、综合分析能力和创新能力的培养主要依靠实验教学来完成。

受传统教育思想的影响,几十年来我国高等师范院校生物科学专业的实验教学以学科知识为体系,从属于理论教学,以验证理论知识和学习实验技术为主要目的,忽视了能力的培养,扼杀了学生的创新欲望。实验内容繁琐,存在着大量的低水平的重复,远远不能适应创新型人才培养的要求。

近年来,随着创新人才教育的开展,能力培养已引起国家和学校的普遍重视。高教部下发的《关于加强高等学校本科教学工作,提高教学质量的若干意见》中特别强调“进一步加强实践教学,注重学生创新精神和实践能力的培养”,指出:“实践教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。高等学校要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验。”但是,与此相适应的教材却很少,尤其是针对生物科学基础实验的系列教材尚未问世。本套能力培养型实验教材就是适应我国高等教育创新性人才培养的需要而编写的。

本套教材将实验分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三种类型。

基础性实验是经过精选的最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验由多种实验手段与技术和多层次的实验内容所组成,要求学生独立完成预习报告、试剂配制、仪器安装与调试、实验记录、数据处理和总结报告。综合性实验主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、对实验的独立工作能力、对实验结果的综合分析能力,为研究性实验的顺利开展做好准备。

研究性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,以相应学科的研究为主结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。部分优秀课程研究论文可进一步深化、充实,作为毕业论文参加答辩。

三种类型实验所占比例根据不同年级、不同课程而确定。低年级课程以基础性实验为主,基础性、综合性 and 研究性实验的比例为 7 : 2 : 1。随年级升高,逐渐增加综合性和研究性实验的比例,基础性、综合性和研究性实验的比例达到



5:3:2。

本套教材试图从下述几个方面有所突破和创新:

1. 以能力培养为核心,通过综合性实验和研究性实验的开设,启发学生思维,引导学生创新。

2. 本套教材是我国高校第一套生物科学基础实验课系列性教材,在编委会的统一领导下完成,避免了低层次重复,体现了实验内容的系统性。

3. 本套教材特别强调实用性和可操作性,实验内容在编写单位已经经过了2~3遍的试用。

4. 本套教材充分体现先进性,尽可能反映生命科学的最新进展。

5. 每本教材都附有实验报告和研究论文范文,为学生提供了实验报告的规范性样板,对培养学生严谨、仔细的学风具有一定的指导作用。

6. 本套教材已着手制作电子光盘版,使之成为立体化教材。多数实验将配有录相和多媒体课件,用于实验之前播放,指导学生的实验操作。

尽管各位主编和编委已经尽了最大努力,但是,由于编者水平所限,肯定会有不少的错误,恳请各位同仁不吝赐教,以便再版时减少谬误。

本套教材得到国家教育部《面向二十一世纪,我国生物教育专业的培养目标、培养方案和课程体系的研究》和山东省高校生物科学(师范类)改革试点专业专项经费的资助,承蒙山东师范大学和科学出版社的领导与朋友的大力支持,在此一并感谢。

安利国

2004年8月

# 前言

遗传学是生物科学专业的一门重要专业课,实验课是理论联系实践,培养和训练学生掌握科学思维方法、实事求是的科学态度与独立的科研动手能力的重要环节和手段。

本书是根据高等学校遗传学教学大纲、山东省实验示范中心的要求,为更好地培养学生的创新意识和创新能力而编写的,是生命科学系列实验教程的一本。除教学大纲规定的实验内容外,本教程在实验原理方面作了必要的扩充和说明。

根据遗传学的学科发展和研究水平,整个教程分为三部分:第一部分基础性实验,共5章,20个实验;第二部分综合性实验,共13个实验;第三部分研究性实验,共6个实验。有的实验列出了多种材料和方法,个别实验内容较多,教师可根据具体情况加以选择。此外,本教程还附有实验室工作规程、实验室一般溶液的配制、组织和细胞培养常用的培养基、各种染色液的配制、实验常用数据、消毒及灭菌、玻璃器皿的洗涤,为基层工作的同志提供了必需的参考资料。本教程还列有实验研究性报告范文,可供学生参考。

在编写过程中,承蒙山东师范大学生命科学学院、聊城大学生命科学学院领导的大力支持,同时引用了国内外许多作者的文献资料,在此谨表谢意。

由于水平有限,时间紧迫,实验设计及编写中的缺点、错误在所难免,希望读者批评指正。

编者

2004年7月



本书在编写过程中力求做到以下几点:

1. 以能力培养为主线,通过综合性实验和研究性实验的开设,启发学生思维,培养学生的创新能力。

2. 本书教材是系列教材,与《物理科学实验》系列教材,在编写委员会的统一领导下完成,避免了重复交叉,体现了实验内容的系统性。

3. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

4. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

5. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

6. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

7. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

8. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

9. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

10. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

11. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

12. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

13. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

14. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

15. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

16. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

17. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。

18. 本书教材注重理论与实践相结合,实验内容在编写单位已经经过教师验证,切实可行,且具有较强的实用性,是专业必修的一门专业学科,也是专业必修的一门专业学科。



# 目 录

出版说明  
前言

## 第一部分 基础性实验

第一章 经典遗传学	( 1 )
实验 1 细胞分裂及染色体行为的观察	( 1 )
实验 2 果蝇的观察及单因子杂交	( 8 )
实验 3 果蝇的伴性遗传	( 14 )
实验 4 果蝇的两对因子的自由组合	( 17 )
实验 5 玉米有性杂交和粒色遗传	( 19 )
实验 6 植物多倍体的诱发和鉴定	( 22 )
第二章 细胞遗传学	( 25 )
实验 7 果蝇唾腺染色体的观察	( 25 )
实验 8 (人类与两栖类)外周血淋巴细胞的培养和染色体 标本制作	( 28 )
实验 9 植物姊妹染色单体区分染色法	( 33 )
实验 10 染色体组型分析	( 36 )
实验 11 植物单倍体的诱发	( 39 )
实验 12 植物组织的培养	( 43 )
第三章 微生物遗传学	( 54 )
实验 13 粗糙链孢霉的杂交	( 54 )
实验 14 酵母菌的杂交	( 59 )
实验 15 <i>E. coli</i> 杂交	( 62 )
实验 16 细菌的局限性转导	( 65 )
第四章 数量和群体遗传学	( 69 )
实验 17 Hardy - Weinberg 遗传平衡定律的检验	( 69 )
实验 18 环境因素对果蝇发生量的影响	( 71 )
第五章 分子遗传学	( 73 )
实验 19 高等植物总 DNA 的提取和纯化	( 73 )

实验 20	聚合酶链反应——PCR .....	( 74 )
-------	-------------------	--------

## 第二部分 综合性实验

实验 21	三点测验的基因定位方法 .....	( 79 )
实验 22	植物有性杂交技术 .....	( 81 )
实验 23	互补测验 .....	( 90 )
实验 24	人体外周血淋巴细胞姊妹染色单体区分染色法 .....	( 94 )
实验 25	小鼠骨髓细胞染色体显带技术与姊妹染色单体 色差法 .....	( 97 )
实验 26	植物原生质体的分离再生 .....	(100)
实验 27	<i>E. coli</i> 的转化 .....	(103)
实验 28	数量性状的遗传参数——遗传力的估算 .....	(108)
实验 29	果蝇某数量性状对于选择的反应 .....	(114)
实验 30	异色瓢虫群体鞘翅斑纹表型与基因型频率的计算 .....	(119)
实验 31	Southern 印迹杂交 .....	(123)
实验 32	质粒 DNA 的提取及酶切 .....	(126)
实验 33	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA .....	(128)

## 第三部分 研究性实验

实验 34	调查人群中某一或某几种性状 .....	(131)
实验 35	观察不同诱变因素对染色体结构的影响 .....	(131)
实验 36	染色质的分离及组成成分分析 .....	(134)
实验 37	某种生物的染色体组型分析 .....	(139)
实验 38	DNA 重组分子的构建与筛选 .....	(140)
实验 39	<i>E. coli</i> 营养缺陷型菌株的诱发和筛选 .....	(142)

## 附录

附录 1	实验室工作规程 .....	(147)
附录 2	实验室一般溶液的配制 .....	(151)
附录 3	组织和细胞培养常用的培养基 .....	(154)
附录 4	常用染色液的配制 .....	(157)
附录 5	实验常用数据 .....	(158)
附录 6	消毒及灭菌 .....	(165)
附录 7	玻璃器皿的洗涤 .....	(167)
附录 8	实验报告范文 .....	(168)

参考文献 .....	(177)
------------	-------

# 第一部分

## 基础性实验

### 第一章 经典遗传学

#### 实验 1 细胞分裂及染色体行为的观察

##### 实验 1.1 植物细胞有丝分裂及染色体行为的观察

###### 【实验目的】

1. 观察植物细胞有丝分裂过程及各时期染色体的特征。
2. 学习并掌握植物染色体玻片标本的制作方法。

###### 【实验原理】

细胞分裂是细胞繁殖的惟一途径，一般分为直接分裂和间接分裂。直接分裂也就是无丝分裂，细胞核直接地一分为二。间接分裂又可分为有丝分裂(图1-1)及减数分裂两种。

对有些染色体数目很多的植物材料，采用压片法制备标本很难获得分散而平整的染色体图像。20世纪50年代后，在哺乳类动物细胞染色体研究中建立的一套完整的低渗法及空气干燥技术，使人类和哺乳类动物染色体的研究得到飞速发展。直到70年代植物原生质体技术发展完善以后，Mouras(1978)等人应用酶解和低渗处理对有丝分裂染色体标本制备方法提出了新的改进。自此，经过国内外学者的不断探索，建立了去壁低渗火焰干燥技术进行植物染色体标本的制备。此法

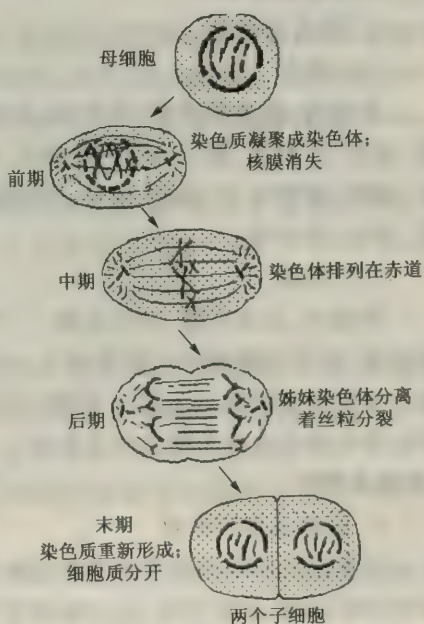


图 1-1 有丝分裂示意图

(修改自 <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/mitosis2.html>)



主要由前处理、酶解去壁、低渗、固定后涂片或制备成细胞悬液滴片、火焰干燥、染色等步骤组成。实验证明,这一技术可以显著提高染色体的分散程度和平整性,现在已广泛应用于植物染色体显带、姊妹染色单体交换等研究中,大大促进了植物细胞遗传学的发展。

植物体生长旺盛的分生组织(如根尖、茎尖、幼叶等)都在进行着有丝分裂。经过取材、固定、解离、染色和压片等处理过程,将细胞分散在装片中,在显微镜下就可看到大量处于有丝分裂各时期的细胞和染色体。有丝分裂中期的染色体具有典型的形态特征,并易于计数。为了获得更多的中期染色体装片,可以采用药物处理或冰冻处理的方法,阻止纺锤体的形成,使细胞分裂停止在中期。同时,通过处理可使染色体缩短变粗,易于分散,便于进行观察研究。另外,通过对组织细胞进行酸性水解或酶处理,可以分解细胞之间的果胶层并使细胞壁软化,细胞容易彼此散开,有利于染色和压片。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

洋葱(*Allium cepa*)、大蒜(*Allium sativum*)的鳞茎,玉米(*Zea mays*)、黑麦(*Secale cereale*)、小麦(*Triticum aestivum*)、蚕豆(*Vicia faba*)的种子等。本实验以大蒜为实验材料。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

显微镜、恒温培养箱、电冰箱、水浴锅、分析天平、1/100 电子天平、电热套或电炉、温度计、剪刀、镊子、刀片、解剖针、载玻片、盖玻片、滤纸、擦镜纸、量筒、量杯、漏斗、玻棒、培养皿、三角瓶、烧杯、试剂瓶、滴瓶、指管、酒精灯、火柴、切片盒、标签、铅笔、胶水、纱布等。

##### (2) 药品

蒸馏水、无水乙醇、95%乙醇、二甲苯、冰醋酸、醋酸钠、苯酚、甲醛、碱性品红、山梨醇、秋水仙素或对二氯苯或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉、中性树胶(或油派胶)、卡诺氏固定液、1 mol/L 盐酸、45%醋酸、1%龙胆紫、4%铁矾水溶液、2%醋酸洋红染色液或改良苯酚品红染色液、2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶混合液。

### 【实验步骤】

#### 1. 材料准备与取材

可直接从田间挖取刚长出的幼嫩根尖,也可以在室内培养根尖。本实验用大蒜根尖作材料,取材方便,而且能够获得较多的根尖,可供多人使用。

首先将大蒜瓣扒去皮,然后用细铁丝串起放在盛清水的培养皿内,使根部与清水接触,在 20~25℃光照条件下培养 2~3 d。待根尖长到 1~2 cm 时,选择健壮根尖,自尖端约 1 cm 处剪下准备预处理用。剪取根尖的时间以上午 10 时左右

为好。

## 2. 预处理

为了阻止纺锤体的活动以获得较多的中期分裂相,同时使染色体相对缩短,便于染色体分散和计数,可对根尖进行预处理。如果只是为了观察有丝分裂各个时期的染色体动态变化而不进行染色体计数,可以不进行预处理。预处理的方法有药物和冰冻预处理两种。

### (1) 药物处理

将材料放在培养皿中,加 0.05%~0.2%秋水仙素水溶液室温下处理 2~4 h。也可用对二氯苯饱和水溶液或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉水溶液室温下处理 3~4 h。这些药物都能使染色体缩短,对染色体有破坏作用。使用时应注意处理的时间,小麦、黑麦、大麦、圆葱和大蒜等处理 2~4 h 为宜,棉花和水稻等处理 2 h 左右为宜。处理时间长短与温度也有很大的关系。

### (2) 冰冻处理

将根尖浸泡在蒸馏水中,置于 1~4℃ 冰箱内或盛有冰块的保温瓶中冰冻 24 h。这种方法对染色体无破坏作用,染色体缩短均匀,效果良好,简便易行,各种作物都适用,但常用于处理禾本科植物材料。

## 3. 固定或前低渗

将经过预处理和未经预处理的材料(用于和经预处理的根尖进行对比)用蒸馏水冲洗 2 次,然后转移到卡诺氏固定液(3 份无水乙醇、1 份冰醋酸,现用现配)中,室温下固定 3~24 h。或者将根尖放入 0.075 mol/L KCl 溶液中低渗处理 20 min,然后再用蒸馏水冲洗 2~3 次。

注意,如果固定后的材料不立即使用,可放在 70%乙醇中,置冰箱或阴暗处保存。用时再用固定液重新固定一下(30 min~3 h)效果会较好。

## 4. 解离

常用的解离方法有 3 种。

1) 将根尖用蒸馏水冲洗 2 次,放入已经在 60℃ 水浴锅中预热的 1 mol/L 盐酸中,在 60℃ 恒温条件下处理 5~10 min,当根尖的伸长区变透明而分生区呈米黄或乳白色时即可取出。

2) 将根尖放入 2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶的等量混合液中(pH 5.0~5.5),室温下处理 3 h 左右。

3) 将根尖放入 95%乙醇和浓盐酸(1:1)混合液中处理 2~10 min,或将根尖放入 5 mol/L 盐酸中处理 5~10 min。

## 5. 染色与压片

将解离好的材料用蒸馏水冲洗以后,转入 45%醋酸中软化 10 min 左右。取 1~2 根软化好的根尖放在载玻片上,用刀片切去伸长区,只留下 1~2 mm 的分生

区(也就是生长点)。滴一滴龙胆紫染色液染色 3~5 min,也可用改良苯酚品红染色液染色 10~15 min,或用醋酸洋红染色液染色 30 min 左右。

染色完毕加上盖片,在酒精灯火焰上过 3~4 次,以手背试之,感觉微烫为宜(如果室内气温较高或认为染色较好,也可不用酒精灯烤片)。在盖片上覆以吸水纸,用左手拇指压住盖片的一角,用右手拿铅笔垂直敲盖片几下,用力要均匀,尽量多敲几下,把材料震散。继续用左手拇指压住盖片一角,用右手拇指用力下压盖片,在保证两玻片不错动的前提下,将材料压成薄薄一层,即可放在显微镜下观察。

#### 6. 镜检

压好的片子先在低倍镜下镜检,找到分裂细胞后,再转换成高倍镜观察染色体的动态变化。注意比较经过预处理和未经预处理的材料的不同之处。如果染色体分散良好,图像清晰,就可以脱水封片,制成永久片。

#### 7. 永久制片

将玻片标本用干冰或制冷器冷冻数分钟,也可放在冰箱中冷冻几小时,取出后用薄刀片掀开,将附着材料的载片或盖片置于 37℃ 恒温箱中烘干,然后在二甲苯中透明 15 min 左右,中性树胶封片,干燥后即可长久保存。

### 【实验报告】

1. 绘出在显微镜下观察到的有丝分裂各时期的图像并注明时期。
2. 经过预处理和未经预处理的片子有何不同?为什么?
3. 制作两张优良的有丝分裂玻片标本,并说明优良有丝分裂玻片标本应该符合哪些标准。
4. 为了便于观察有丝分裂的过程及其中染色体的动态变化,最好应该选择什么样的材料,为什么?
5. 预处理、固定、解离、染色、烤片、压片的作用分别是什么?它们各自对时间有什么要求?

(郭善利 周国利)

## 实验 1.2 减数分裂及染色体行为的观察

### 【实验目的】

1. 了解高等动、植物配子形成过程中减数分裂的细胞学特征,重点掌握染色体在其中的动态变化过程,为研究遗传学的基本规律奠定细胞学基础。
2. 学习用植物花药和动物精巢制备减数分裂玻片标本的方法。



**【实验原理】**

减数分裂是在配子形成过程中发生的一种特殊的细胞分裂形式。其特点是：细胞连续进行两次分裂，而染色体只在减数分裂第一次分裂前复制一次，形成的性细胞只含有体细胞染色体数的一半。在减数分裂的前期Ⅰ，初级性母细胞中的同源染色体配对、联会并进行染色体片段的交换。中期Ⅰ时，同源染色体成对排列在赤道板两侧。后期Ⅰ时，同源染色体由纺锤丝分别拉向两极，而每条染色体的两条子染色体仍由着丝粒连接在一起，结果形成了染色体数目减半的次级性母细胞。次级性母细胞接着进行减数分裂的第二次分裂。在中期Ⅱ时，染色体的着丝粒分开，每个染色单体所形成的子染色体分别分配到子细胞中去，结果形成单倍数的性细胞(图 1-2 和 1-3)。总之，在减数分裂的整个过程中，同源染色体之间要发生联会、交换、分离，非同源染色体之间要发生自由组合。通过染色体的规律性变化，使最终产生的四个子细胞内染色体数目只有母细胞的一半。

高等植物花粉形成过程中，花药内的某些细胞分化成小孢子母细胞，小孢子母细胞经过减数分裂形成四个单倍的小孢子(单核花粉)。在适当的时机采集植物的花蕾(花序)，进行固定、染色、压片，可以在显微镜下观察到小孢子母细胞减数分裂的过程和染色体的动态变化。

性成熟的动物精巢中，不断地进行着减数分裂。将动物精巢固定、染色、压片后，在显微镜下可以看各个时期的分裂相。注意有丝分裂与减数分裂染色体行为的不同(图 1-4)。

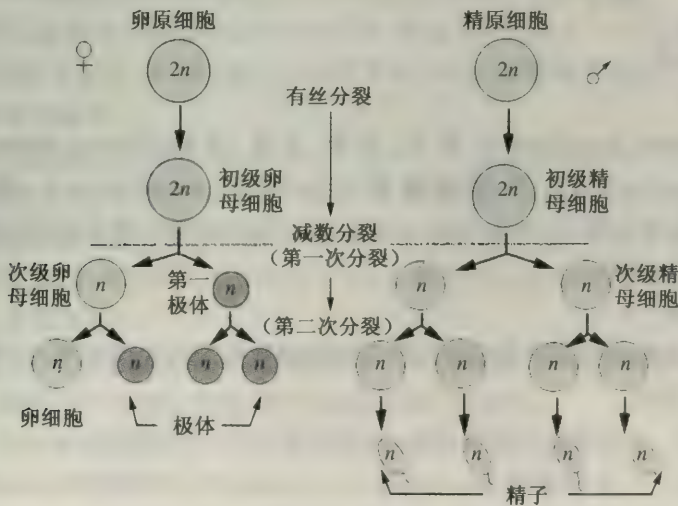


图 1-2 减数分裂的细胞行为示意图

(修改自 <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/mitosis2.html>)

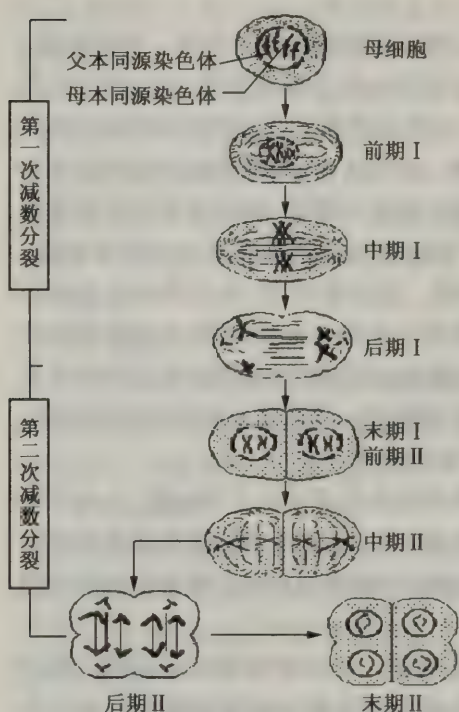


图 1-3 减数分裂的染色体行为示意图

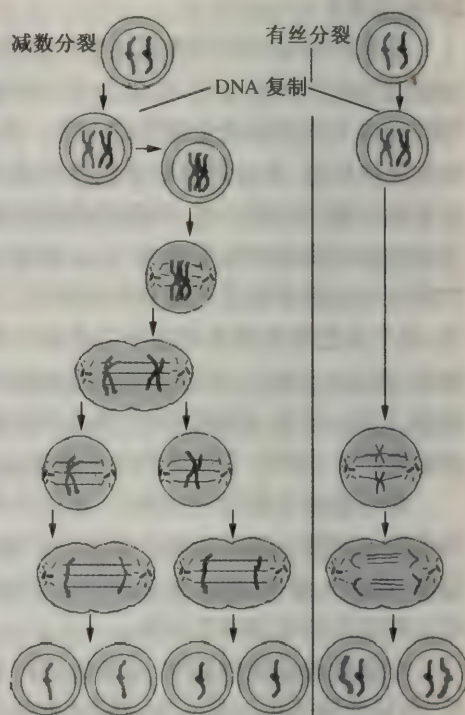


图 1-4 减数分裂与有丝分裂的比较

(修改自 <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/mitosis2.html>)

## 【材料与用品】

### 1. 材料

葱 (*Allium fistulosum*)、蚕豆、玉米、小麦、水稻 (*Oryza sativa*)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、短角斑腿蝗 (*Catantops brachycerus*)、稻蝗 (*Oxya chinensis*)、东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*) 等。本实验以大葱花药和蝗虫精巢为实验材料。

#### (1) 植物

选取适当大小的花蕾是观察花粉母细胞减数分裂的关键步骤。不同植物的取材时期有所不同。

1) 大葱 春季花序嫩绿饱满、总苞光滑时可以取材固定。

2) 蚕豆 从现蕾开始, 可选取 1~2 mm 大小的花蕾或一小段花序进行固定。

3) 玉米 在抽雄前 2 周左右(大喇叭口期), 用手指从喇叭口处向下挤捏叶鞘, 触到有松软感处, 即是雄花序的所在部位。在该处用刀片纵向划一切口, 用镊

子取出花序分枝。此时雄花序先端小穗颖长 4 mm 左右,花药长 2~3 mm,每一分枝中上部小穗发育最早。

4) 小麦 在旗叶挑出后,旗叶与下一叶片的叶耳距约 2~3 cm 时取材较好。但不同品种间稍有差异。

5) 水稻 以旗叶叶耳低于下一叶叶耳 5~6 cm 开始减数分裂,两叶叶耳重叠(间距为 0)时为减数分裂盛期。早稻、晚稻减数分裂开始的时间稍有差异,一般颖花长度为 3 mm 时开始,4 mm 时为盛期,6 mm 时减数分裂则已终止。

6) 棉花 棉花现蕾后即进入减数分裂时期。由于其花序分节着生,因此常按花蕾的长度取材。如陆地棉,一般在三角苞长到 1 cm 左右花萼与花瓣等长,整个花蕾长 3~5 mm 时取材较好。

## (2) 蝗虫的采集

夏末秋初野外捕捉蝗虫(短角斑腿蝗、稻蝗、东亚飞蝗、土蝗或负蝗)雄性成体。直接用卡诺氏固定液固定 3~24 h,换入 70%乙醇中保存。

## 2. 用具及药品

镊子、解剖针、载玻片、盖玻片、大培养皿、立式染缸、酒精灯、量筒、吸水纸和显微镜等。卡诺氏固定液、醋酸洋红(或改良苯酚品红)染色液、无水乙醇、冰醋酸、甘油、松香、中性树胶或油派胶(Eupral)、石蜡、45%醋酸等。

## 【实验步骤】

### 1. 大葱花药涂片观察

#### (1) 取材和固定

将花序总苞剥去,用卡诺氏固定液固定,固定 3 h 后换入 70%乙醇中。如果要保存较长时间,可放在 70%乙醇与甘油的等量(体积比)溶液中保存。

#### (2) 染色与涂片

取花序用蒸馏水冲洗后,取上、中、下部各 2 个花蕾放在载玻片上,用解剖针剥出每个花蕾的 2~3 个花药集中在一起,加 1 滴染色液在花药上,用解剖针反复挤压花药,使花粉母细胞进入染色液中,用镊子去净药壁残渣,再加 1 滴染色液染色 10 min 左右。较大的花药可以先用刀片切碎,然后挤压出花粉母细胞。

#### (3) 压片及镜检

加上盖片,上面附吸水纸,用拇指适当、均匀地加压,将周围的染色液吸干(展片)。先在低倍镜下寻找分裂相,然后换高倍镜仔细观察。

### 2. 蝗虫精巢的观察

#### (1) 取精巢

用镊子夹住雄虫尾部向外拉,找到一团由小管栉比排列构成的黄色组织块,这就是蝗虫的精巢。如果是新鲜材料,要放入卡诺氏固定液中固定 2 h 左右,之后再放入 70%乙醇中保存。



### (2) 染色和压片

剔除精巢上的其他组织,用镊子夹取一小段管状精管放到载玻片上,加适量染色液,染色 15 min 以上。在酒精灯火焰上过 2~3 次,加盖片,覆以吸水纸压片。

### (3) 镜检

显微镜下可观察到减数分裂各时期的分裂相以及精子的形成过程。

染色良好的、分裂相比较多的片子也可制作成永久标本。皿内置一短玻棒,倒入约 2/3 的固定液。将选好的片子翻过来(有材料的面向下),一端搭在玻棒上,在固定液中浸泡。待盖片自然脱落后,与载玻片一起轻轻移入 95% 乙醇 $\xrightarrow{1\text{ min}}$ 无水乙醇 $\xrightarrow{1\text{ min}}$ 无水乙醇 $\xrightarrow{1\text{ min}}$ 加 Eupral 1 滴,封片,贴上标签。

### 【实验报告】

1. 根据自己的观察,绘出下列各期的图像,并简述粗线期、终变期、中期 I、后期 I、中期 II、后期 II 的特点。
2. 显微镜下区分花粉母细胞和药壁细胞,说明其特点。
3. 观察蝗虫精母细胞的减数分裂和精子的形成过程。
4. 要得到很好的实验结果,取材应该注意什么?
5. 结合观察减数分裂过程中染色体形态结构的变化,简述减数分裂过程中有哪些重要的遗传学事件发生?
6. 比较动、植物减数分裂的差异。

(郭善利 周国利)

## 实验 2 果蝇的观察及单因子杂交

### 【实验目的】

1. 了解果蝇生活史各个阶段的形态特征,掌握果蝇雌、雄成虫和几种常见突变性状的主要区别方法。
2. 学习实验果蝇的饲养管理、实验操作、培养基的配制等方法。
3. 掌握果蝇单因子的杂交方法和杂交结果的统计处理方法,理解分离定律的原理。

### 【实验原理】

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)为双翅目昆虫,具完全变态。用作实验材料的优点是:① 容易饲养,生活周期短(20℃左右,约 15 d 一代);② 繁殖能力较强,每只受精的雌虫约可产卵 400~600 粒,因此在短时间内可获得较大的子代群体,有利于遗传学分析;③ 突变类型多,研究得较清楚的突变已达 400 多个,且

多数是形态特征的变异,便于观察;④唾腺染色体较大。因此,果蝇在遗传学研究中得到广泛应用,积累了许多典型材料。

按照孟德尔第一定律,即分离定律,基因是一个独立的单位。基因完整地从一个代传递到下一代,由该基因的显隐性决定其在下一代的性状表现。一对杂合状态的等位基因(如 A/a)保持相对的独立性,在减数分裂形成配子时,等位基因(A/a)随同源染色体的分离而分配到不同的配子中去。理论上配子的分离比是 1 : 1,即产生带 A 和 a 基因的配子数相等,因此,等位基因杂合体的自交后代表现为基因型分离比 AA : Aa : aa 是 1 : 2 : 1,如果显性完全,其表型分离比为 3 : 1,这就是分离定律的基本内容。通过果蝇一对因子的杂交实验,即可以验证它(图 1-5)。

【材料与用品】

1. 材料

饲养的野生型和几种常见突变型果蝇。单因子杂交实验可选用黑腹果蝇的长翅(野生型)纯合体、残翅(突变型)纯合体作为实验材料。

2. 用具及药品

(1) 用具

双筒解剖镜、显微镜、放大镜、小镊子、麻醉瓶、培养瓶、白瓷板(或玻璃板)、毛笔、棉塞、软木塞或橡胶塞、恒温培养箱(最好是生化培养箱)、小滴瓶、载片、盖片、吸水纸、纱布等。

(2) 药品

琼脂、蔗糖(或白砂糖)、乙醇、氯仿(或乙醚)、丙酸(或苯甲酸)、玉米粉、酵母粉(或鲜酵母)。

【实验步骤】

1. 果蝇的观察

(1) 生活史

果蝇生活史(图 1-6)包括受精卵、幼虫、蛹、成虫四个发育阶段。果蝇生活周期的长短与培养温度直接相关,30℃以上引起果蝇不育和死亡,低温则使其生活周期延长,如 10℃左右时,生活周期长达约 57 d。果蝇生长的最适温度为 20~25℃。20℃左右时,整个生活周期约需 15 d。各发育阶段

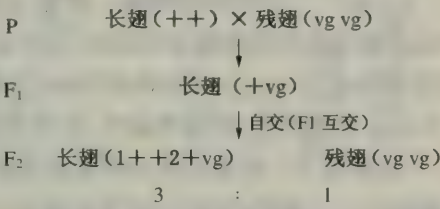


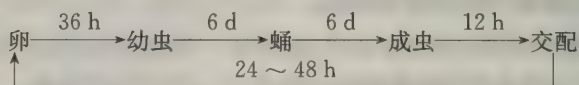
图 1-5 果蝇单因子杂交图  
(周国利做)



图 1-6 果蝇的生活史

(引自邱奉同,刘林德 1992)

所需时间如下：



用放大镜从培养瓶外观察果蝇生活史的四个时期，并掌握各阶段的特点及其在果蝇杂交实验时应注意的问题。

1) 卵 羽化后的雌蝇一般在 12 h 后交配。果蝇杂交时必须用处女蝇，因此选择处女蝇的时间是在羽化后 12 h 以内(为保证实验准确可靠，选择处女蝇时，以选择羽化后 8 h 以内的雌蝇为好)。雌蝇交配后两天开始产卵，卵的长度约为 0.5 mm，为椭圆形，腹面稍扁平，在背面的前端有一对触丝。

2) 幼虫 幼虫从卵中孵化出来后即为 一龄幼虫，一龄幼虫经两次蜕皮成为三龄幼虫。一龄幼虫很小，在培养基中不易看见。三龄幼虫较大，常爬在培养基表面或培养瓶壁上。三龄幼虫体内前端有一对半透明的唾腺，就是做唾腺染色体的实验材料。三龄幼虫的活动力强而贪食，在爬过的培养基上留下一道沟，若整个培养基被幼虫钻出多而深的沟，表明幼虫生长良好。

3) 蛹 幼虫生活 6~7 d 后即化蛹，化蛹一般在瓶壁上，呈梭形，起初颜色淡黄，以后逐渐硬化且变为深褐色，深褐色的蛹就是即将羽化的了。

4) 成虫 刚羽化出来的果蝇，虫体较长，翅未完全展开，体表白嫩；以后会逐步几丁质化，颜色逐步变深。

## (2) 麻醉果蝇

1) 制备麻醉瓶 用干净培养瓶或与培养瓶口径相同的玻璃瓶并配备相应的软木塞或橡胶塞，在软木塞的下面钉一铁钉，在铁钉上缠一小团棉花。或可在软木塞上打一小孔，塞上一折叠的吸水纸。或可在橡胶塞上划一切口，夹住一折叠的吸水纸。

2) 引出果蝇 将有果蝇的培养瓶用手轻拍，使果蝇震落瓶底，迅速拔去棉塞，将麻醉瓶与培养瓶的两口相对，培养瓶在下、麻醉瓶在上并朝向灯光处，双手遮住培养瓶，利用果蝇的趋光性和向上性，将果蝇引入麻醉瓶。

3) 麻醉 在麻醉瓶瓶塞的棉球或吸水纸上滴加 1~2 滴乙醚或氯仿，迅速塞入麻醉瓶口，0.5~1 min 左右大部分果蝇即被麻醉落入瓶底，摇动麻醉瓶，全部果蝇震落瓶底，之后立即将果蝇倒在白瓷板或玻璃板上，用毛笔小心拨动观察。如果用于杂交，翅膀外展的果蝇不能使用。

## (3) 辨认果蝇成虫雌雄个体

正确而迅速地辨认果蝇性别，是果蝇杂交中选择处女蝇的关键。较老化的雌雄成蝇区别很

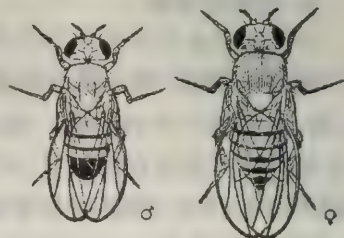


图 1-7 雌、雄果蝇背面观

(引自梁彦生等 1989)



明显,可以用放大镜、解剖镜或肉眼直接观察。刚刚羽化出来的果蝇不易区别,可在体视显微镜下观察区分。雌、雄成蝇的鉴别特征如图 1-7~1-9 和表 1-1。

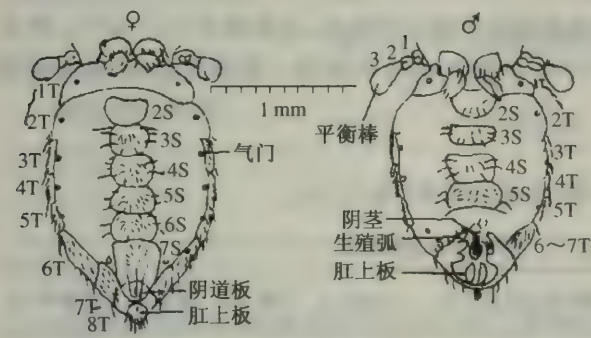


图 1-8 雌、雄果蝇腹部腹面观  
(引自梁彦生等 1989)

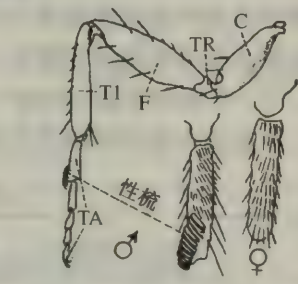


图 1-9 雄果蝇右前足上的性梳  
(引自梁彦生等 1989)

表 1-1 果蝇成虫、雌雄特征比较表

	雌 果 蝇	雄 果 蝇
体 型	大	小
腹 部	末端尖 背面: 环纹 5 节, 无黑斑 腹面: 腹片 7 节	末端钝 背面: 环纹 7 节、延续到末端呈黑斑 腹面: 腹片 5 节
第一对足	跗节基部无性梳	跗节基部有黑色鬃毛状性梳

(4) 果蝇常见突变类型的观察

野生型果蝇为灰体、长翅、红眼、直刚毛,常见的突变性状见表 1-2。

表 1-2 果蝇常见突变类型

突 变 名 称	基 因 符 号	性 状 特 征	在染色体上座位
白眼(white)	w	复眼白色	X1.5
棒眼(bar)	B	复眼横条形,小眼数少	X57.0
黑檀体(ebony)	e	身体成乌木色,黑亮	ⅢR70.7
黑体(black)	b	体黑色,比黑檀体深	ⅡL48.5
黄体(yellow)	y	全身呈浅橙黄色	X0.0
残翅(vestigial)	vg	翅明显退化,部分残留,不能飞	ⅡR67.0
焦刚毛(singed)	sn3	刚毛卷曲如烧焦状	X21.0

(5) 果蝇原种保存

为了保证果蝇杂交试验材料的充分供应,必须保存一定数量和种类的果蝇原种。

1) 原种要纯。每次转移培养基都要严格检查有无混杂,如发现同一原种群体

内有其他类型,应立即丢弃,以保证群体的纯度。

2) 每隔 2~3 周换一次新鲜的培养基,每瓶 4~8 对,每一原种至少保留两套,并注明类型和转移日期。

3) 平时保存可放在生化培养箱内或恒温培养箱内,温度调至 15~18℃。扩大培养和实验时将温度调至 20~25℃,以便加快生长繁殖。夏季高温时,最好用可制冷的生化培养箱保存原种。

#### (6) 果蝇培养基的配制

实验室内最常用的是玉米-糖-琼脂培养基(表 1-3)。

表 1-3 果蝇培养基成分表

配 方	水/ml	琼脂/g	蔗糖(或白砂糖)/g	玉米粉/g	丙酸/ml	酵母粉(或鲜酵母)/g
①	80	1.5	13	10	0.5	0.5
②	100	1	10	10	0.5	0.5

配方①可用于培养杂交果蝇,因培养基较干稠,可避免黏着果蝇。配方②可用于原种保存,因培养基较稀,可延长培养时间。两种培养基也可都用苯甲酸而不用丙酸。

1) 按配方称量好各种成分。

2) 用 2/3 的水把琼脂调匀,加热熔化,再把蔗糖(或白砂糖)加入溶解,用剩余的 1/3 水把玉米粉调成糊状,倒入上液中,不断搅拌,继续煮沸至黏稠均匀为止,最后倒入丙酸搅匀后,将培养基倒入干净的培养瓶(可用小广口瓶、三角瓶、粗试管、牛奶瓶等),培养基厚度以 1.5~2 cm 为宜,最后用纱布包扎的棉塞塞好瓶口,冷却凝固。

3) 用前 1~2 d,在培养基表面撒少量干酵母粉,或用玻璃棒接种鲜酵母悬液,25℃左右培养 2 d,使培养基发酵,另将一张无菌的折叠滤纸片放入瓶内,以利果蝇产卵和停歇。

### 2. 果蝇的单因子杂交实验

#### (1) 选择处女蝇

将长翅果蝇和残翅果蝇培养瓶内已羽化的成蝇全部杀死,此后凡羽化后未超过 8 h 的雌蝇即是处女蝇。例如,可于 6:00 处死已羽化成蝇,14:00 采集第一次处女蝇,22:00 第二次采集,次日 6:00 采集第三次。

#### (2) 杂交

正交:长翅果蝇♀×残翅果蝇♂;反交:残翅果蝇♀×长翅果蝇♂。各做两瓶,每瓶新培养基中各移入 3~5 对种蝇。贴好标签,注明杂交组合、杂交日期及实验者姓名。

#### (3) 移去亲本

7~8 d 后移去亲本。

(4) 观察 F<sub>1</sub>

4~5 d 后 F<sub>1</sub> 成虫出现,观察其翅膀形态后处死。连续观察记录 3 d,各自记录正、反交(表 1-4)。

表 1-4 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 观察结果记录表

观察结果统计日期	正 交		反 交	
	长翅数	残翅数	长翅数	残翅数
月 日				
合 计				

(5) F<sub>1</sub> 互交

在新培养瓶内,每瓶各放入 3~5 对 F<sub>1</sub> 果蝇(无需处女蝇),培养。

(6) 移去 F<sub>1</sub>

7~8 d 后,移去 F<sub>1</sub> 成蝇,麻醉致死,放入废蝇盛留瓶。

(7) 观察 F<sub>2</sub>

4~5 d 后,F<sub>2</sub> 成蝇出现,观察翅膀形态后处死,隔天记录一次,连续观察统计 4 次正、反交的结果并记录(表 1-4)。

(8) 数据处理及  $\chi^2$  测验

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

式中,O 是观察值,E 是预期值。

根据  $\chi^2$  值和自由度 ( $df = 1$ ),查表,若  $P \geq 5\%$ ,说明观察值与理论值相符合,也就是说,可以认为观察值是符合分离定律的(表 1-5)。

表 1-5  $\chi^2$  测验结果统计表(正反交合并统计)

长 翅	残 翅	合 计
观察值(O)		
预期值(E)(3 : 1)		
$(O-E)^2/E$		

【实验报告】

1. 如何区分果蝇成蝇的雌、雄个体?
2. 统计分析果蝇单因子实验结果,并用  $\chi^2$  测验验证实验结果是否与分离定律相符。
3. 果蝇杂交时,为什么要选择处女蝇?
4. 在做杂交时会出现表型分离比不符合 3 : 1 的比例,为什么?
5. 果蝇麻醉时的注意事项有哪些?



6. 在进行亲本杂交和  $F_1$  自交后一定时间为什么要倒去杂交亲本?

7. 根据你的实验结果记录,对所做杂交过程作一遗传分析,对所研究的性状及基因可得出哪些结论?(提示:首先判断是染色体遗传还是核外遗传,再判定是否是伴性遗传,然后确定是显性还是隐性遗传)

(姚志刚)

## 实验 3 果蝇的伴性遗传

### 【实验目的】

1. 了解伴性基因、非伴性基因在遗传方式上的区别,验证并加深理解伴性遗传规律。

2. 观察伴性性状在正、反交时后代表现的差别。

### 【实验原理】

位于性染色体上的基因叫做伴性基因,其遗传方式与位于常染色体上的基因有一定差别,它在亲代与子代之间的传递方式与雌雄性别有关。伴性基因的这种遗传方式就称为伴性遗传。

果蝇的性别决定类型是 XY 型,具有 X 和 Y 两种性染色体,雌性是 XX,为同配性别;雄性是 XY,为异配性别。伴性基因主要位于 X 染色体上,而 Y 染色体上基本没有相应的等位基因。所以这类遗传也叫 X 连锁遗传。

控制果蝇红眼和白眼性状的基因位于 X 染色体上,在 Y 染色体上没有相应的等位基因,它们随着 X 染色体而传给下一代。如以纯合红眼雌蝇和纯合白眼雄蝇杂交,子代均为红眼, $F_2$  中雌蝇均为红眼,雄蝇中半数为红眼,半数为白眼。以纯合白眼雌蝇与纯合红眼雄蝇杂交, $F_1$  雌蝇均为红眼,雄蝇均为白眼, $F_2$  中无论雌蝇和雄蝇均有半数为红眼,半数为白眼(图 1-10)。正反交结果不同,这是伴性遗传的典型特点。

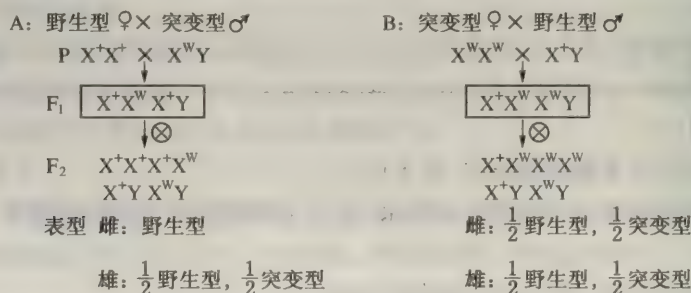


图 1-10 果蝇伴性遗传的杂交图

(周国利做)

若 A 为正交, B 就是 A 的反交。由图 1-10 所示遗传过程可见, 正交和反交后代性状表现是不一样的, 从 B 组合可见  $F_1$  的雌雄性状表现不一样, 而常染色体性状遗传正、反交所得子代雌雄性状表现相同(参阅实验 4)。所以, 正反交后代雌雄性状表现是区分伴性遗传和常染色体遗传的一个重要特征。另外, 从染色体的传递可以看出, 子代雄性个体的 X 染色体均来自母体, 而父体的 X 染色体总传递给子代雌性个体, X 染色体的这种遗传方式叫做交叉遗传。由此, X 染色体上的基因亦以这种方式传递。这是伴性遗传的又一特征。

在进行伴性遗传实验时也会出现例外个体, 即在 B 杂交组合,  $F_1$  中出现不应该出现的雌性白眼, 这是由于两条 X 染色体不分离造成的。这种情况极为罕见, 约几千个个体中有一个。不分离现象如图 1-11 所示。

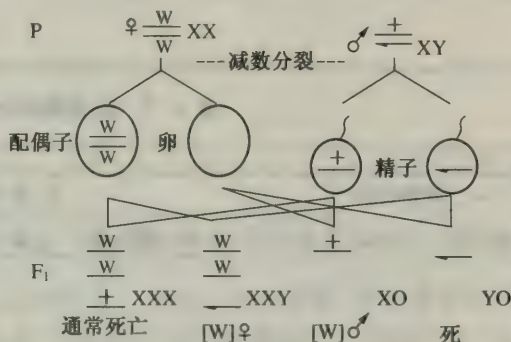


图 1-11 果蝇的不分离现象

### 【材料与用品】

#### 1. 材料 (引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

黑腹果蝇品系: 野生型(红眼)( $X^+X^+$ ,  $X^+Y$ )、突变型(白眼)( $X^wX^w$ ,  $X^wY$ ), 白眼基因座位在 X 染色体上。

#### 2. 用具及药品

同实验 2。

### 【实验步骤】

#### 1. 选择处女蝇

选取纯合红眼处女蝇(野生型)和纯合白眼处女蝇(突变型), 分别放于含新鲜培养基的培养瓶内饲养备用。

#### 2. 杂交

将处女蝇和雄蝇分别麻醉, 选取红眼处女蝇和白眼雄蝇(各 3~5 只)放于同一培养瓶内, 作为正交实验。另选取白眼处女蝇和红眼雄蝇(各 3~5 只)放于另一培养瓶内, 作为反交实验。写明标签(注明杂交组合、杂交日期及实验者姓名), 放在 20~25℃ 的培养箱内培养。第二天观察果蝇的存活情况, 如有死亡, 应及时补充。

#### 3. 移去亲本果蝇

7~8 d 后移去杂交瓶内的亲代果蝇, 核对亲本性状。

#### 4. 观察 $F_1$

待  $F_1$  成蝇出现并达一定数量后, 将  $F_1$  果蝇引出麻醉, 观察记录  $F_1$  性状, 检查是否与预期性状相一致, 填入表 1-6 和 1-7 中。

表 1-6  $F_1$  观察统计表(正交)

杂交组合: \_\_\_\_\_ 实验者: \_\_\_\_\_

统计日期 \ 观察结果	各类果蝇的数目	
	红 眼 雌	红 眼 雄

表 1-7  $F_1$  观察统计表(反交)

杂交组合: \_\_\_\_\_ 实验者: \_\_\_\_\_

统计日期 \ 观察结果	各类果蝇的数目	
	红 眼 雌	红 眼 雄

5.  $F_1$  自群繁殖选取正、反交组合的  $F_1$  各 5~6 对,分别放入另一新培养瓶内。6. 移去  $F_1$  果蝇7~8 d 后,移去  $F_1$  果蝇继续培养。7.  $F_2$  果蝇观察与记录待  $F_2$  成蝇出现后,每隔 1 天引出麻醉 1 次,观察记录其性状,连续统计 4~5 次,并且每次要分别统计雌、雄个体数目,将统计数字列入表 1-8 和 1-9 中。表 1-8  $F_2$  观察统计表(正交)

实验者: \_\_\_\_\_

统计日期 \ 观察结果	各类果蝇的数目			
	红 眼 雌	白 眼 雌	红 眼 雄	白 眼 雄

合 计

百分比

预期值(E)(1:1:1:1)

 $(O-E)^2/E$



表 1-9 F<sub>2</sub> 观察统计表(反交) 实验者: \_\_\_\_\_

统计日期	观察结果	各类果蝇的数目			
		红 眼 雌	白 眼 雌	红 眼 雄	白 眼 雄

合 计

百分比

预期值(E)(1:1:1:1)

$(O-E)^2/E$

### 8. $\chi^2$ 测验

利用公式  $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$  计算  $\chi^2$  值,根据  $\chi^2$  值和自由度( $df=3$ ),查  $\chi^2$  表。若  $P \geq 5\%$ ,说明观察值与理论值相符合。对这个实验来说,意味着实验结果应该是符合伴性遗传规律的,也就是说,眼色的这对性状是由位于性染色体(X染色体)上的一对等位基因控制的。

### 【实验报告】

1. 统计实验结果,进行  $\chi^2$  测验,验证实验结果是否符合伴性遗传规律。
2. 如何选择处女蝇?
3. 做实验时为什么要做正、反交?
4. 列出一些果蝇的伴性遗传性状。

(姚志刚)

## 实验 4 果蝇的两对因子的自由组合

### 【实验目的】

1. 了解果蝇两对相对性状的杂交方法,验证并加深理解遗传的自由组合定律。
2. 记录杂交结果,掌握数据统计处理方法。

### 【实验原理】

位于非同源染色体上的两对基因,在减数分裂形成配子时可以自由组合;又由于配子的随机结合,导致它们所决定的两对相对性状在杂种第二代是自由组合的。一对基因所决定的性状在杂种二代是 3:1 之比,两对不相互连锁的基因所决定的性状,在杂种二代就呈 9:3:3:1 之比。

果蝇两对因子的自由组合如图 1-12 所示。

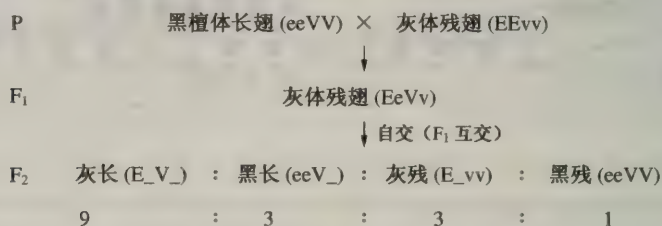


图 1-12 果蝇双因子杂交图

(周国利做)

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

黑腹果蝇的野生型：灰体、长翅；突变型：黑檀体(e, 位于第三染色体)、残翅(vg, 位于第二染色体)。

#### 2. 用具及药品

同实验 2。

### 【实验步骤】

#### 1. 选择处女蝇

将已羽化的成虫全部杀死, 此后凡自羽化开始未超过 8 h 的雌蝇即是处女蝇。选取野生型(灰体、长翅)处女蝇和突变型(黑檀体、残翅)处女蝇, 分别放于含新鲜培养基的培养瓶内保存备用。

#### 2. 杂交

正交：野生型处女蝇 ♀ × 黑檀体、残翅雄蝇 ♂；反交：黑檀体、残翅处女蝇 ♀ × 野生型雄蝇 ♂。各做 2 瓶, 每瓶中分别移入 3~5 对种蝇。贴好标签, 注明杂交组合、杂交日期及实验者姓名。

#### 3. 移去亲本

7~8 d 后移去亲本果蝇, 处死。

#### 4. 观察 F<sub>1</sub>

4~5 d 后 F<sub>1</sub> 成蝇出现, 观察其性状后处死。连续观察并记录正、反交 3 d (表 1-10)。

#### 5. F<sub>1</sub> 互交

按原来的正、反交各选 3~5 对 F<sub>1</sub> 成蝇(无需处女蝇), 移入新培养瓶中, 继续培养。

#### 6. 移去 F<sub>1</sub>

7~8 d 后移去 F<sub>1</sub> 成蝇。

### 7. 观察 $F_2$ 及实验结果记录

4~5 d 后  $F_2$  成蝇出现, 观察  $F_2$  性状后处死, 隔天观察记录一次, 连续观察统计 4~5 次(8~10 d), 正、反交结果各自记录(表 1-10)。

表 1-10  $F_1$ 、 $F_2$  观察结果记录表

子代类型 统计日期	正 交				反 交			
	灰 长	黑 长	灰 残	黑 残	灰 长	黑 长	灰 残	黑 残
合 计								

### 8. 数据处理及 $\chi^2$ 测验

计算  $\chi^2$  值(表 1-11), 根据  $\chi^2$  值和自由度( $df=3$ ), 查  $\chi^2$  表, 若  $P \geq 5\%$ , 说明观察值与理论值相符合, 也就是说, 可以认为观察值是符合自由组合定律的。

表 1-11  $\chi^2$  测验结果统计表

子代类型 参 数	灰 长	黑 长	灰 残	黑 残	合 计
观察值(O)					
预期值(E)					
(9:3:3:1)					
$\frac{(O-E)^2}{E}$					

#### 【实验报告】

1. 统计分析实验结果, 并用  $\chi^2$  测验验证实验结果是否与自由组合定律相符。
2. 分析此次实验成败的原因。
3.  $F_1$  代是否要选择处女蝇, 为什么?

(姚志刚)

## 实验 5 玉米有性杂交和粒色遗传

#### 【实验目的】

1. 学习玉米有性杂交的技术和方法。
2. 分析玉米粒色的遗传方式, 了解其遗传控制的机制。

#### 【实验原理】

玉米具单性花, 是雌雄同株的异花授粉作物。它果穗大、籽粒多, 具有明显的



遗传变异性状,便于遗传分析,加之杂交方法简便,所以被普遍应用于遗传学实验研究中。

玉米籽粒(颖果)的性状包括籽粒色泽、成分、形状等。籽粒的形状有马齿形和硬粒,由1对等位基因控制。淀粉层的性状有糯性与非糯性、甜与非甜、凹陷与非凹陷等,各由1对等位基因控制。玉米籽粒颜色的遗传较复杂,淀粉层的黄色与白色由1对等位基因控制,果皮的红色与花斑(红白条纹)、棕色与白色由2对等位基因控制,糊粉层的紫、红、白色主要由7对等位基因控制。鉴别籽粒颜色属于何层,可先用水将籽粒浸软,然后用镊子或小刀分层剖析探查。在玉米粒色的遗传中,“有色”对“无色”为完全显性。

### 1. 玉米的花器构造

玉米的雄花序为圆锥花序,通常称雄穗,由主轴和分枝构成。主轴顶端和分枝上着生许多成对小穗,每个小穗由2片护颖和2朵雄花组成,每朵雄花由1片内颖和1片外颖、3个雄蕊和1个退化的雌蕊组成,雄蕊分花丝和花药两部分。

玉米的雌花序为肉穗状花序,通常叫雌穗,由穗柄、苞叶、穗轴和雌小穗组成。穗轴上着生许多纵行排列成对的小穗。小穗无柄。每个小穗有2朵花,一朵正常一朵退化。正常花由内颖、外颖和雌蕊组成。雌蕊由子房和花柱构成。花柱很长呈丝状,俗称玉米须,顶端二裂、着生茸毛并分泌黏液,便于黏住花粉。花柱各部位都有接受花粉的能力。

### 2. 开花习性

玉米开花通常以雄穗散粉和雌穗吐丝为标志。雄穗先抽出,抽穗后2~3 d开始开花,花期1周左右。开花的顺序是从主轴中上部开始,由此向上向下依次开放。侧枝开花顺序也是如此。玉米雄穗昼夜均能开花(散粉),而每天上午8~10时开花最多,午后显著减少。

玉米雄穗开花与温度、湿度条件有密切关系。温度25~23℃,相对湿度70%~90%时开花最多,低于18℃或高于38℃雄花不开放,相对湿度低于60%时开花很少。花粉生活力在温度28~30℃、相对湿度65%~80%的田间条件下,能保持5~6 h,8 h后显著下降,24 h后完全丧失生活力。

玉米雌穗花柱一般在雄穗散粉2~4 d后开始抽出。通常,中下部的花柱先抽出苞叶,然后下部、上部的花柱陆续抽出。花柱从开始抽出到全部抽出一般需5~7 d。花柱一抽出就具有接受花粉的能力。授粉后变为褐色而枯萎,未授粉的花柱不断伸长(可达40 cm),色泽新鲜。柱头的生活力可以保持10 d以上,以抽出2~3 d接受花粉的能力最强。

### 【材料与用品】

硫酸纸制套袋或牛皮纸袋(小袋20 cm×14 cm,大袋28 cm×16 cm)、回形针、大头针、小刀、镊子、铅笔、标签、70%乙醇。

### 【实验步骤】

#### 1. 选地播种

选择两块地力均匀,四周有围墙或高秆作物遮挡或屏蔽的试验田,以防外来花粉混杂。播种前深耕施肥,整理好待种。

选择具有表 1-12 中性状的纯系亲本(若材料不纯,须自交提纯后方可使用)及其  $F_1$ ,分块播种到实验田中,待玉米开花时进行杂交实验。

表 1-12 杂交组合及目的

组 合	目 的	组 合	目 的
黄色、白色及其 $F_1$	验证分离规律	黄色非糯、白色糯型及其 $F_1$	验证自由组合规律
糯型、非糯及其 $F_1$		白色凹陷、黄色非凹	验证连锁规律
凹陷、非凹及其 $F_1$			

#### 2. 套袋隔离

为了防止自然授粉,在母本雌穗抽出叶鞘未吐丝前进行套袋隔离。套袋要用回形针固定好,以免被风吹落。等到花柱抽出 3~4 cm 长时,在授粉前一天下午用大袋将父本雄穗套住。袋口用回形针扣紧,以免被风吹落。

#### 3. 授粉

人工授粉一般在上午 8:00~10:00 进行。采集花粉时,将父本雄穗稍稍弯下,轻轻抖动套在穗上的纸袋,使花粉落在纸袋内,除去回形针,小心取下雄花袋。然后取下母本上的雌穗套袋,观察雌穗上花丝的情况,若花丝过长,可用剪刀剪去一部分,并立即将父本花粉抖落在花丝上。授粉完毕,雌穗上仍套上纸袋,挂上标签,写明杂交组合、授粉日期及实验者姓名。由于同一果穗不同部位的雌花并不处在同一发育阶段,所以需要进行 2~3 次人工授粉,以确保授粉完全。授粉 2~3 d 后可以去掉穗上的套袋,但为确保无其他花粉传粉,可将套袋保留至籽粒灌浆期以后。应注意授粉时切勿混入其他植物上的花粉,雄穗的套袋不可连续使用,以免混杂。

#### 4. 结果统计与遗传分析

根据实际情况,可用当年杂交的果穗进行统计分析,也可用事先收集或购买的  $F_1$ 、 $F_2$  代果穗进行分析、统计。

杂 交 组 合	子代类型及籽粒数			

对统计结果进行  $\chi^2$  测验,根据  $\chi^2$  值和自由度查  $\chi^2$  表,得到  $P$  值,从而确定基因的遗传方式。

子代类型

观察数( $O$ )

理论预期数( $E$ )

$$d = O - E$$

$$d^2/E$$

$$\chi^2 = \sum d^2/E$$

### 【注意事项】

1. 当用黄粒玉米作父本、白粒玉米作母本进行杂交时,母本当代就结出黄色的籽粒,这种黄色当代就能表现出来的现象叫做当代显性。

2. 杂交的同时要留一部分亲本进行自交留种,即同时将一株的雄、雌穗套袋隔离,然后自交。

### 【实验报告】

1. 将每个杂交组合所收获的果穗进行观察鉴别、统计分析,说明控制性状的基因的遗传方式。

2. 写出实验成功与失败的原因。

3. 授粉时应该注意哪几点?

(邱奉同)

## 实验 6 植物多倍体的诱发和鉴定

### 【实验目的】

1. 了解人工诱导植物多倍体的原理、方法及其在植物育种上的意义。

2. 鉴别诱导后染色体数目的变化。

### 【实验原理】

自然界各种生物的染色体数目一般是相当稳定的,这是物种的重要特征。例如黑麦体细胞染色体为 14 条,配成 7 对。遗传学上把一个配子的染色体数,称为染色体组,用  $n$  表示。如黑麦染色体组内包含 7 个染色体,它的基数  $X = 7$ 。一个染色体组内每个染色体的形态和功能各不相同,但又相互协调,共同控制生物的生长、发育、遗传和变异。

由于各种生物的来源不同,细胞核内可能具有一个或一个以上的染色体组,凡是细胞核中含有一套完整染色体组的就叫做单倍体,亦用  $n$  表示。具有两套染色体组的生物体称为二倍体,以  $2n$  表示。细胞内多于两套染色体组的生物体则称为多倍体。如三倍体( $3n$ )、四倍体( $4n$ )、六倍体( $6n$ )等,这类染色体数目的变化是以染色体组为单位的增减,所以称作整倍体。



按染色体组的来源,在整倍体中又可区分为同源多倍体和异源多倍体。凡增加的染色体组来自同一物种或者是原来的染色体组加倍的结果,称为同源多倍体。如果增加的染色体组来自不同的物种,则称为异源多倍体。

多倍体普遍存在于植物界,目前已知被子植物中有  $1/3$  或更多的物种是多倍体,如小麦属(*Triticum*)染色体基数是 7,属二倍体的有一粒小麦,四倍体的有二粒小麦,六倍体的有普通小麦。除了自然界存在的多倍体物种之外,又可采用高温、低温、X 射线照射、嫁接和切断等物理方法人工诱发多倍体植物。在诱发多倍体的方法中,以应用化学药剂更为有效。如秋水仙素、萘嵌戊烷、异生长素、富民农等,都可诱发多倍体,其中以秋水仙素效果最好,使用最为广泛。

秋水仙素是由百合科植物秋种番红花——秋水仙(*Colchicum autumnale*)的种子及器官中提炼出来的一种生物碱,化学分子式为  $C_{22}H_{25}NO_6$ ,具有麻醉作用,对植物种子、幼芽、花蕾、花粉和嫩枝等可产生诱变作用。它的主要作用是抑制细胞分裂时纺锤体的形成,使染色体不走向两极而被阻止在分裂中期,这样细胞不能继续分裂,从而产生染色体数目加倍的核。若染色体加倍的细胞继续分裂,就形成多倍性的组织。由多倍性组织分化产生的性细胞,所产生的配子是多倍性的,因而也可通过有性繁殖方法把多倍体繁殖下去。

多倍体已成功地应用于植物育种,用人工方法诱导的多倍体,可以得到一般二倍体所没有的优良经济性状,如粒长、穗长、抗病性强等。三倍体西瓜、三倍体甜菜、八倍体小黑麦已在生产上应用。在单倍体育种(如花粉培养、花药培养等)中,最终也需进行加倍才能获得具有育性的品种,这也要用到多倍体诱导技术。

### 【材料及用品】

#### 1. 材料

洋葱,刮去老根,放在小烧杯上,加水至刚与根部接触为止,室内培养至新根长出  $0.5 \sim 1.0$  cm 左右。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

显微镜、烧杯、量筒、酒精灯、镊子、刀片、载片、盖片、小滴瓶、指管、吸水纸、铅笔等。

##### (2) 药品及试剂

$0.1\%$ 秋水仙素水溶液、 $1\text{ mol/L}$  HCl、无水乙醇、 $70\%$ 乙醇、 $45\%$ 醋酸、改良苯酚品红染色液、卡诺氏固定液等。

### 【实验步骤】

#### 1. 多倍体诱导

当洋葱新根长至  $0.5 \sim 1.0$  cm 左右时,将上述小烧杯中的水换成含  $0.1\%$ 秋水仙素的水溶液,置阴暗处培养 2 d,至根尖膨大为止。

## 2. 固定

11:30 左右,用蒸馏水冲洗根尖 2 次,切取根尖末端约 0.5 cm 投入卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中,固定 2~8 h,95%乙醇冲洗一次,换入 70%乙醇保存。

## 3. 解离

1 mol/L HCl 解离 6~8 min,以根尖伸长区透明、分生区呈乳白色时停止解离为宜,水洗 3 次。

## 4. 染色

在载片上切取根尖膨大处的前部(呈乳白色的区域),用镊子(或另一载片)将其挤碎,在载片上有材料之处加一滴改良苯酚品红染色液,染色 8~10 min。

## 5. 压片

覆一盖片,酒精灯火焰上微烤,用铅笔硬头敲击压片,然后隔吸水纸用拇指展平,吸去多余染液。

## 6. 观察

低倍镜下寻找染色体分散良好的分裂相,换高倍镜观察染色体数目。

### 【实验报告】

1. 绘出所观察到的多倍体细胞的染色体图。
2. 秋水仙素诱发多倍体的原理是什么?
3. 说出能够诱发多倍体的其他因素,想一想用这些因素应该怎么做这个实验?
4. 根尖经秋水仙素处理之后为什么会发生膨大?

(张爱民)

## 第二章 细胞遗传学

### 实验 7 果蝇唾腺染色体的观察

#### 【实验目的】

1. 练习分离果蝇幼虫唾腺的技术,学习唾腺染色体的制片方法。
2. 观察果蝇唾腺染色体的结构特点。
3. 了解果蝇唾腺染色体在遗传学研究中的意义。

#### 【实验原理】

20 世纪初, Kostoff 用压片法首先在 *D. melanogaster* 果蝇幼虫的唾液腺细胞核中发现了特别巨大的染色体——唾液腺染色体(salivary gland chromosome)。事实上, 双翅目昆虫(如摇蚊、果蝇等)的幼虫期都具有很大的唾腺细胞, 其中的染色体就是巨大的唾液腺染色体。这些巨大的唾液腺染色体具有许多重要特征, 为遗传学研究的许多方面(如染色体结构、化学组成、基因差别表达等)提供了独特的研究材料。

双翅目昆虫的整个消化道细胞发育到一定阶段之后就不再进行有丝分裂, 而停止在分裂间期。但随着幼虫整体器官以及这些细胞本身体积的增大, 细胞核中的染色体, 尤其是唾液腺染色体仍不断地进行自我复制而不分开, 经过许多次的复制形成约 1 000~4 000 拷贝的染色体丝, 合起来达 5  $\mu\text{m}$  宽、400  $\mu\text{m}$  长, 比普通中期分裂相染色体大得多(约 100~150 倍), 所以又称为多线染色体(polytene chromosome)和巨大染色体(giant chromosome)。

唾腺染色体形成的最初, 其同源染色体即处于紧密配对状态, 称为体细胞联会。在以后不断的复制中仍不分开, 由此成千上万条核蛋白纤维丝合在一起, 紧密盘绕。所以配对的染色体只呈现单倍数。黑腹果蝇的染色体数为  $2n=2\times 4$ , 其中第Ⅱ、第Ⅲ染色体为中部着丝粒染色体, 第Ⅳ和第Ⅰ(X 染色体)染色体为端着丝粒染色体(图 1-13)。而唾腺染色体形成时, 染色体着丝粒和近着丝粒的异染色质区聚于一起形成一染色中心(chromocenter), 所以在光学显微镜下可见从染色中心处伸出 6 条配对的染色体臂, 其中 5 条为长臂, 1 条为紧靠染色中心的很短的臂(图 1-14)。

由于唾腺细胞在果蝇幼虫时期一直处于细胞分裂的间期状态, 每条核蛋白纤维丝都处于伸展状态, 因而不同于一般有丝分裂中期高度螺旋化的染色体。唾腺染色体经染色后, 呈现深浅不同、疏密各异的横纹(band)。这些横纹的数目、



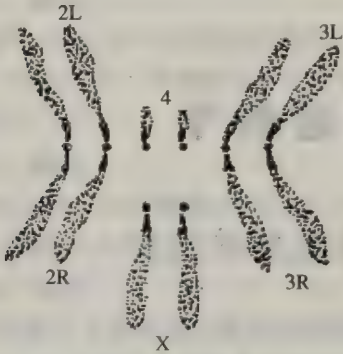


图 1-13 果蝇唾腺染色体核型图

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

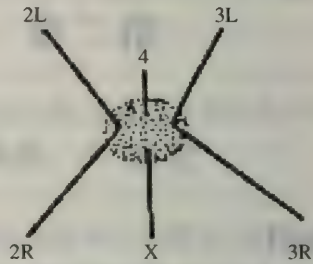


图 1-14 果蝇唾腺染色体模式核型

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

位置、宽窄及排列顺序都具有种的特异性。研究认为, 这些横纹与染色体的基因是有一定关系的。从其横纹分布特征可对物种的进化特征进行比较分析, 而一旦染色体上发生了缺失、重复、倒位、易位等, 也可较容易地在唾腺染色体上观察识别出来。可见唾腺染色体技术是遗传学研究中一项基本的技术。唾腺染色体上的横纹宽窄、浓淡是一定的, 但在果蝇的特定发育时期会出现不连续的膨胀, 称为疏松区(puff)。目前人们认为这是这部分基因被激活的标志。

多线染色体的特征: ① 染色体巨大, 远远超过一般体细胞染色体大小; ② 唾腺细胞始终处于分裂的前中期状态, 且同源染色体配对在一起, 故观察到的多线染色体数为  $n$ ; ③ 各条多线染色体上具有异染色质的着丝粒部分相互靠拢, 形成染色中心; ④ 由于 DNA 螺旋化程度不同, 多线染色体上的横纹, 表现为深浅不同、疏密相间, 是基因所在的位置。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

普通果蝇中野生型或任何突变型的三龄幼虫活体。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

显微镜、双筒解剖镜、解剖针、镊子、载片、盖片、吸水纸、酒精灯、铅笔等。

##### (2) 药品及试剂

改良苯酚品红或醋酸洋红、生理盐水(0.85% NaCl)、1 mol/L HCl、蒸馏水、45%乙酸。

### 【实验步骤】

#### 1. 幼虫的培养

对用来观察唾腺染色体的果蝇幼虫, 要给予较好的培养条件。培养瓶内幼虫

不应过多,最好每隔两天将羽化的新蝇移出一次,以免瓶内产生过多的卵。此外,应放在较低的温度下培养( $15\sim 17^{\circ}\text{C}$ 较好),长成的幼虫亦较大。唾腺应取自充分发育的三龄幼虫,在其化蛹之前常爬到培养基外,或附在瓶壁上,可及时选用。

## 2. 唾腺的剖取

选取发育良好的果蝇三龄幼虫(图 1-15)放于载片上,加 1 滴生理盐水,如幼虫身体上有培养基,可用生理盐水洗一次。然后将载片放于解剖镜下,两手各持一只解剖针,用一只压住幼虫末端的  $1/3$  处,另一只按住头部黑点处(口器),用力向前拉,不要停留和挪动针头,把头部自身体拉开,这时可以看见一对透明微白的长形小囊即为唾腺。唾腺两侧常带有脂肪体,可用针小心剔除。如头部拉开后不见唾腺,可用解剖针小心在虫体头部拨动寻找。

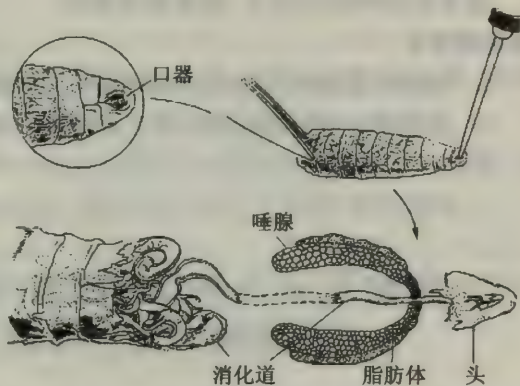


图 1-15 果蝇唾腺的分离操作示意图

(引自傅焕延等 1987)

## 3. 解离

将剖离的腺体用解剖针头挑至加有 1 滴  $1\text{ mol/L HCl}$  的载片上,解离 2 min,用吸水纸小心吸去  $\text{HCl}$ ,加  $1\sim 2$  滴蒸馏水冲洗,再用吸水纸吸去水分。

## 4. 染色压片

将解离好的唾腺(也可不经解离直接染色)上加 1 滴改良苯酚品红染液,染色  $10\sim 20\text{ min}$ 。用吸水纸吸去染液,加 1 滴  $45\%$  的醋酸,上覆以盖片,酒精灯上稍微加热,一手按住盖片勿动,一手用铅笔头轻敲盖片几下,然后隔吸水纸用拇指压片,使染色体展平,吸去多余染液。

## 5. 观察

先在低倍镜下观察,寻找染色体分散好的图像,可以看到由一个染色中心展现出 5 条弯曲的染色体臂(X、II L、II R、III L、III R)和一个点状的第 4 对染色体(图 1-16)。第一对染色体为性染色体,组成一个臂。第二和第三对染色体各自组成了具有两臂的染色体对,它们的着丝区都聚集在染色中心。第四对染色体较小,因而在

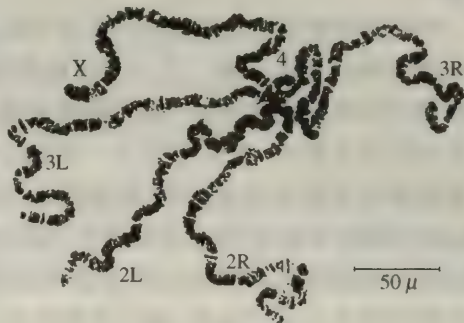


图 1-16 果蝇唾腺染色体图

(引自梁彦生等 1989)

染色中心处只看到一个点状物。然后换高倍镜观察染色体上的横向带纹,对照模式照片可以辨认出染色体的个体性。

#### 6. 永久制片

选取较好的临时压片,制成永久封片。

### 【实验报告】

1. 绘制所观察的分散较好的唾腺染色体图像。
2. 果蝇唾腺染色体在遗传学上有哪些应用?

(姚志刚)

## 实验 8 (人类与两栖类)外周血淋巴细胞的培养和染色体标本制作

### 【实验目的】

1. 学习人体外周血淋巴细胞的悬浮培养方法和人类染色体的标本制备方法。
2. 探索两栖类动物淋巴细胞培养及染色体标本制备方法。

### 【实验原理】

通常情况下哺乳动物的外周血中是没有分裂相细胞的,只有在异常情况下才能发现。低等动物(如两栖类)外周血中也只是偶尔能见到分裂相。外周血中的小淋巴细胞几乎都处在  $G_1$  期或  $G_0$  期。用外周血作材料进行染色体制片须用一定方式使血细胞进入分裂。采用人工离体培养的方法,在培养基中加入植物血球凝集素(phytohemagglutinin, PHA)能刺激人和其他动物小淋巴细胞转化为淋巴母细胞而进行有丝分裂。这样经过短期培养后,用秋水仙素处理,就可使大量分裂的细胞停止于中期,从而可以获得足够的体外生长群体和有丝分裂中期相,以供染色体制片。

外周血培养有许多方法,大多以 1960 年 Moorhead 等人建立的人体外周血白细胞培养技术为基础。这一方法比较完善,但是采血量较大,操作较繁琐。后来发展了不少改进的方法,其中微量全血培养技术在国内外被广泛采用。这一方法不但采血量少,而且省去了一些离心、分离血浆等操作过程,操作简便化。从染色体标本制备的角度看,虽然培养过程所需设备条件和操作程序相对复杂,但由于它能在不伤害供血者的情况下取材,或可在同一个体内连续地对比较材,以观察药物或环境因素对人类或动物的影响以及染色体的动态变化,而且能在短时期内获得大量分裂相,制出清晰的染色体标本,所以采用微量全血培养法制备染色体标本不论在遗传学研究还是在医学临床染色体诊断上,都有广泛的应用。



**【材料与用品】**

## 1. 材料

人外周血,蟾蜍或青蛙血液。

## 2. 用具及药品

## (1) 用具

2 ml 无菌注射器、采血针、棉签、剪刀、镊子、离心管、吸管、试管架、量筒、培养瓶、试剂瓶、酒精灯、烧杯、载玻片、切片盒、精密 pH 试纸、记录本。

分析天平、离心机(水平式、4 000 r/min)、恒温培养箱(电热隔水式)、烘箱、干燥箱(50~300℃)、超净工作台、普通冰箱、恒温水浴、高压灭菌锅、赛氏滤器。

## (2) 药品

RPMI 1604、小牛血清、肝素、PHA、双抗(青霉素+链霉素)、2%碘酒、75%乙醇、10 μg/ml 秋水仙素、氯化钾、甲醇、冰醋酸、5%碳酸氢钠、氯化钠。

**【实验步骤】**

## 1. 器皿的清洗和消毒

动物细胞体外培养要求培养器皿非常洁净。玻璃器皿在使用前,均用肥皂水洗刷,清水冲净,烘干后浸泡在洗液中至少 2 h,再用流水冲洗,最后用蒸馏水、双蒸水各冲洗 3 遍,在烘箱中烤干,包扎,0.15 MPa 高压灭菌 20 min。

隔离衣、口罩、橡皮塞等也用 0.15 MPa 高压灭菌 15 min。

## 2. 药剂准备

## (1) RPMI 1640 培养基

称取 RPMI 1640 粉末 10.5 g,用 1 000 ml 的双蒸水溶解,如溶液出现混浊或难以溶解时,可用干冰或 CO<sub>2</sub> 气体处理,在 pH 值降至 6.0 时,则可溶解而透明,呈橘红色。每 1 000 ml 溶液加 NaHCO<sub>3</sub> 1.0~1.2 g,以干冰或 CO<sub>2</sub> 气体校正 pH 至 7.0~7.2。立即以 G<sub>5</sub> 或 G<sub>6</sub> 细菌漏斗过滤灭菌,分装待用。

## (2) 小牛血清

用赛氏滤器过滤除菌。

## (3) PHA

这是淋巴细胞有丝分裂刺激剂。市售每安瓿 10 mg,配成 2 mg/ml 溶液。也可自行提取,提取方法有两种。

1) 盐水浸取法 直接用四季豆的浸出液。取四季豆 20 g,用水冲洗几次,洗去种子外面的尘土和可能黏附的化学药物。在 4℃ 条件下在水中浸泡过夜,次日倒去水分,将豆子放入组织搅碎器内,加 30 ml 生理盐水,开动搅碎器使之成为

\*  $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2 = 1 \text{ kg}/(\text{m} \cdot \text{s}^2)$ ,与过去惯用单位 psi 之间的换算关系为:  $1 \text{ psi} = 1 \text{ bf/in}^2 = 6.89476 \times 10^3 \text{ Pa}$ 。

黏糊状,向搅碎器中再加 70 ml 生理盐水,混合均匀,4℃冰箱中静置 24 h。然后以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用生理盐水稀释 10 倍, $G_5$  除菌滤斗过滤,分装小瓶,冰冻保存。

2) 乙醇乙醚提取法 取四季豆 50 g,洗净后将豆浸入 60 ml 盐水中保存于 4℃冰箱内,24 h 后用组织搅碎器将其磨成匀浆,再加 140 ml 盐水,4℃冰箱中静置 24 h。取出后以 6 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液,用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 5.6,然后每 100 ml 上清液加 40 ml 无水乙醇,加以搅拌,再以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,弃去沉淀。在每 100 ml 上清液中加 170 ml 10% 乙醚无水乙醇 (10 ml 乙醚+90 ml 无水乙醇)以 3 000 r/min 离心 15 min,取沉淀放入培养皿中,在含有硅胶的抽气干燥器中抽气 2~4 d,沉淀物逐渐变硬,可以制得粉末保存。将沉淀物研磨成粉末,用 0.85% NaCl 液配成 1% 的溶液,此 PHA 溶液经细菌滤器过滤后分装在小瓶中,冰冻保存。使用时每 5 ml 培养物加 0.1 ml 即可。

#### (4) 肝素

作为抗凝剂使用。称取粉末 160 mg (每 mg 含 125 单位),用 40 ml 的生理盐水溶解,此溶液的浓度为 500 单位/ml。0.056 MPa 高压灭菌 15 min。

#### (5) 抗生素

1) 青霉素 (以每瓶 40 万单位为例) 以 4 ml 生理盐水 (或培养基) 稀释,则每 ml 含 10 万单位。取 1 ml 加入 100 ml 培养基中,则最终浓度为 100 单位/ml。

2) 链霉素 (以每瓶 50 万单位为例) 以 2 ml 生理盐水 (或培养基) 稀释,则每 ml 含 25 万单位。取 0.4 ml (含 10 万单位) 加入 1 000 ml 培养基中,则每 ml 含 100 单位 (即  $100\text{ }\mu\text{g}$ , 100 万单位=1 g)。

#### (6) 秋水仙素

作为有丝分裂的阻止剂,它能改变细胞质的黏度,抑制细胞分裂时纺锤体形成,使细胞分裂停留在中期。称取秋水仙素 4 mg,用 100 ml 生理盐水溶解,用  $G_6$  细菌漏斗过滤,然后放入冰箱 4℃ 保存。使用时用 1 ml 注射器吸取该溶液 0.05~0.1 ml 加入 5 ml 的培养基中,其最终浓度为 0.4~0.8 mg/ml。

#### 3. 培养液的分装

在无菌条件下,用移液管将培养液和其他各试剂分装入培养瓶,每瓶量为:培养液 (RPMI 1640) 4 ml、小牛血清 1 ml、PHA 0.2 ml、肝素 0.05 ml、双抗 (青霉素+链霉素),在培养液中最终浓度各为 100 单位/ml。

用 3.5%  $\text{NaHCO}_3$  调 pH 到 7.2~7.4,分装到 20 ml 的玻璃瓶中,用橡皮塞塞紧,待用或置于 0℃ 条件下保藏。用前从冰箱内取出,放入 37℃ 恒温锅中温育 10 min。

#### 4. 采血

用 2 ml 灭菌注射器吸取肝素 (500 单位/ml) 0.05 ml 湿润管壁。用碘酒和乙醇消毒皮肤,自肘静脉采血约 0.3 ml,在酒精灯火焰旁,自橡皮塞向培养瓶内 (内

含有生长培养基 5 ml) 接种, 轻轻摇动几次, 直立置  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  恒温箱内培养。

### 5. 培养(图 1-17)

置  $37^\circ\text{C}$  温箱内培养 66~72 h。

### 6. 秋水仙素处理

培养终止前在培养物中加入浓度为  $40 \mu\text{g/ml}$  的秋水仙素 0.05~0.1 ml, 最终浓度为  $0.4 \sim 0.8 \mu\text{g/ml}$ , 置温箱中处理 2~4 h。

### 7. 低渗处理

低渗液的种类较多, 如  $0.075 \text{ mol/L}$  的 KCl 溶液、 $0.95\%$  的枸橼酸钠溶液, 用蒸馏水稀释 4 倍的 Hanks 液, 也可直接用蒸馏水。秋水仙素处理完毕, 小心地从温箱取出培养瓶, 用滴管吸去上清液, 培养物沉积在瓶底, 然后加入温育的低渗液 5 ml, 用滴管轻轻冲打成细胞悬液, 装入离心管中置  $37^\circ\text{C}$  温箱内处理 20 min, 使红细胞破碎, 白细胞膨胀。

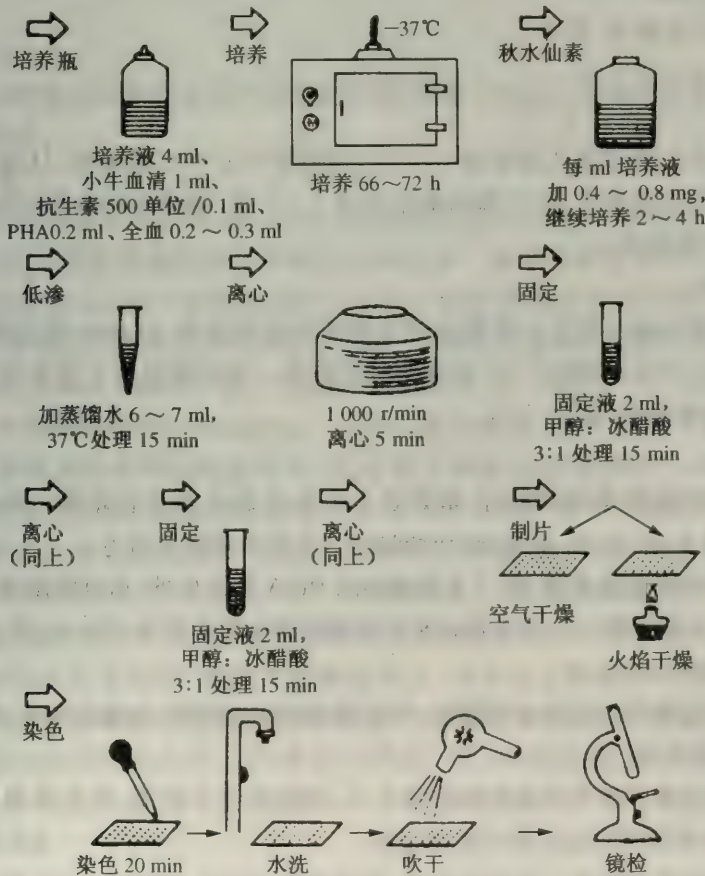


图 1-17 人体外周血液与染色体标本制作示意图

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)



## 8. 固定

### (1) 预固定

在低渗的同时,可加以 1~2 ml 固定液进行预固定,以防止离心时细胞结团。

### (2) 离心

1 000 r/min, 5 min, 弃去上清液, 收集白细胞。

### (3) 固定

固定液为甲醇:冰醋酸=3:1。每只离心管中,加入固定液 2~4 ml,片刻后用滴管轻轻冲打成细胞悬液,在室温中固定 15 min 后,离心,吸去上清液,留下白细胞。

### (4) 再固定

加入固定液 2 ml,用吸管轻轻打散,室温下继续固定 15 min,离心,除去上清液,留下白细胞。

### (5) 第三次固定、离心

操作同上。

## 9. 滴片

向上述离心管中滴入固定液 0.5 ml,用滴管小心冲打成悬液,从冰箱的冰格中或冰水中取出载玻片,每片滴加细胞悬液 1~3 滴,用嘴轻轻吹散,用电吹风吹干,或自然干燥备用。

## 10. 镜检

用磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释后的吉姆萨染色液扣染 20 min,然后倒去染液,用蒸馏水轻轻冲洗。待稍干后,在显微镜下检查。先在低倍镜下寻找良好的分裂相,然后用油镜观察(图 1-17)。

### 【注意事项】

1. 接种的血样愈新鲜愈好,最好是在采血后 24 h 内进行培养。如果不能立刻培养,应置于 4℃ 存放,避免保存时间过久,会影响细胞的活力。

2. 培养中成败的关键,除了至为重要的 PHA 的效价外,培养的温度和培养液的酸碱度也十分重要。人的外周血淋巴细胞培养最适温度为  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。培养液的最适 pH 为 7.2~7.4。

3. 培养过程中如发现血样凝集,可将培养瓶轻轻振荡,使凝块散开,继续放回 37℃ 恒温箱内培养。

4. 制片过程中如发现细胞膨胀得不大,细胞膜没有破裂,染色体聚集一团伸展不开,可将固定时间延长数小时或过夜。

5. 用两栖类动物淋巴细胞培养时,培养基除 RPMI 1640 外,还应补充一定量的水解乳蛋白,培养基的 pH 为 7.0~7.2,培养温度为 26℃。

**【实验报告】**

1. 培养基中各种成分的作用如何?
2. 总结一下微量全血培养过程的要点,有哪些方面需要特别注意?
3. 在低倍和中倍镜下,观察制片中分裂相的多少和染色体制片的质量,寻找分散适宜、不重叠、收缩适中、染色体不过度分开、形态清晰的分裂相。然后在油镜下仔细观察染色体的数目和形态。注意区分观察男性和女性的正常染色体制片。选择一有代表性分裂相进行显微摄影以供做核型等进一步的分析。

(邱奉同)

## 实验 9 植物姊妹染色单体区分染色法

**【实验目的】**

学习植物姊妹染色单体区分染色的原理,探索 Feulgen 法染色技术,观察植物细胞染色单体。

**【实验原理】**

姊妹染色单体区分染色法(sister chromatid differential staining, SCD)是 20 世纪 70 年代中期发展起来的一种染色处理技术。通过这种技术,可以在光学显微镜下清晰地区分 DNA 复制后的染色单体。植物根尖分生组织是细胞旺盛分裂的部位,在细胞分裂间期 DNA 复制过程中,碱基类似物 5-溴脱氧尿嘧啶(5-Bromodeoxy uridine, BrdU)或 5-碘脱氧尿嘧啶(5-Iodo-2'-deoxy uridine, IdU)可以代替胸腺嘧啶(Thymidine, T)掺入新合成的 DNA 链中。在适当浓度 5-溴脱氧尿嘧啶中培养的植物根尖,经过两个细胞分裂周期后,一条染色体的两条染色单体的 DNA 双链在化学组成上出现了差别:其中一条染色单体的两条 DNA 单链中的 T 位均由 5-溴脱氧尿嘧啶所代替(称为 BB 染色单体);而另一条染色单体的两条 DNA 双链中的一条单链含 5-溴脱氧尿嘧啶核苷,另一条单链(原始母链)则不含 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(称为 BT 染色单体)。用改良的 BrdU-Feulgen 法染色时,采用的盐酸浓度大,又加长了酸解的时间,在这样的条件下,两条染色单体对酸解的反应出现了差异。BB 染色单体比 BT 单体耐水解,当用席夫试剂染色时,BB 单体呈深色,BT 单体呈浅色,从而形成鲜明对比。

**【材料与用品】**

1. 材料

蚕豆,也可选择洋葱或大蒜。

## 2. 用具及药品

### (1) 用具

水浴锅、显微镜、载玻片、盖玻片、吸水纸、解剖针。

### (2) 试剂

1) 500  $\mu\text{mol/L}$  5-溴尿嘧啶 15.4 mg 5-溴尿嘧啶定容于 100 ml 双蒸水中,避光(棕色瓶盛放,外加包黑纸)保存于 4℃ 冰箱中。

2) 0.05%秋水仙碱溶液(双蒸水配制)、45%冰醋酸。

3) 3.5 mol/L HCl 比重 1.18 g/ml 盐酸 288.8 ml,加蒸馏水定容至 1 000 ml。或根据公式算出:

$$\text{所需液体的体积(ml)} = \frac{MV_m}{Pd}$$

4) 改良席夫试剂 0.5 g 碱性品红加入 100 ml 沸水中,继续煮沸 5 min,并不断搅拌,使之溶解,冷却至 50℃ 时过滤至棕色瓶中,加 1 mol/L HCl 30 ml,冷却到 25℃ 时再加偏重亚硫酸钠 3 g,塞紧瓶口,充分振荡,包上黑纸贮存于冷凉处。此液最好在 2 周内用完,不宜久存。

## 【实验步骤】

### 1. 水培根尖

将蚕豆种子埋入潮湿的木屑中,待初生根长至 3~5 cm 时,剪去根尖生长点和胚芽端,促使侧根生长。然后将蚕豆换用青霉素小瓶水培,培养温度为 25℃ 左右。

或者去除洋葱和大蒜鳞茎基部干死的老根,于小烧杯中水培至根尖长 3~5 cm。

### 2. 掺入 5-溴尿嘧啶

将培养的根尖材料移至 500  $\mu\text{mol/L}$  5-溴尿嘧啶溶液中,继续严格地避光培养 34~36 h,此时分裂细胞经过了两个 DNA 复制期,5-溴尿嘧啶掺入到了 DNA 中。

### 3. 预处理

剪取根尖,浸入 0.05%秋水仙碱溶液中 3.5~4 h。

### 4. 固定

将根在清水中冲洗 5 min,移入卡诺氏固定液中固定 2~3 h。

### 5. 染色——改良的孚尔根染色法

#### (1) 水解

严格的 40℃ (恒温水浴) 条件下,用 3.5 mol/L HCl 水解 40~55 min。

#### (2) 染色

从 40 min 起每隔 5 min 取部分根尖,放入改良的席夫试剂中染色,直至根尖



呈现深紫红色(约 45 min 以上)。

## 6. 压片、观察

材料染色后,可不经漂洗直接压片观察。将染色后的根尖放在干净的载玻片上,用吸水纸吸去外面附着的席夫试剂,切去根尖伸长区(未着色部分),用镊子和解剖针将根尖捣碎拨散(或用另一载片将材料夹散),加一小滴 45% 醋酸(注意加 45% 醋酸不宜太多,否则压片时材料易随醋酸液逸出玻片外),盖上盖片,以左手食指和中指压住盖玻片边缘,防止盖片错动,右手持解剖针以针尖轻轻敲击盖玻片,赶去盖片下的小气泡,同时使材料均匀分散。然后,覆两层吸水纸,以用铅笔的平头端敲击,使细胞进一步分散铺展,染色体分散开。显微镜下观察。

### 【注意事项】

选择染色体分散开的离散细胞进行观察,在高倍镜下即能看清姊妹染色单体间呈现的浓淡差别。部分染色体上出现自发的姊妹染色单体互换,凡在染色单体端部出现的互换计为一个 SCE,在中部出现的互换计为两个 SCE。

1. BrdU 的掺入是显示 SCD 的重要基础。由于植物种子萌发过程中自身合成的胸苷与外来的 BrdU 发生竞争性矛盾,所以若处理不当往往会造成掺入不进,导致试验失败。因此,要注意选择饱满、发芽势强的蚕豆种子。并要注意抓住掺入的时机,一定要在大多数侧根长 0.5~1.5 cm 时开始掺入,因为此时侧根和幼芽的生长是最旺盛时期,BrdU 容易掺入。

2. 温稀酸的延长水解是本实验的关键步骤,水解的温度和时间要由专人管理,严格控制,温差不能超过  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。通常较明显的区分染色效果出现在水解 45~50 min 处理中。水解处理后不必用水洗,可直接转入席夫试剂染色。

3. 本实验所采用的席夫试剂配方,比常规加大了偏重亚硫酸钠和盐酸的用量,这样有助于加强区分染色的对比反差。如果镜检感觉颜色仍较淡,还可利用醋酸-乳酸-地衣红复染,增强染色效果。

4. 如果仅进行临时封片镜检时,可在 45% 醋酸中加入 5% 的甘油,能减缓片中的水分干燥。对于染色效果特别好的玻片标本,可用冰冻法脱去盖片,再以中性树胶封固制成永久片。

### 【实验报告】

1. 绘制在含有 BrdU 的培养液中连续生长 2 个以上周期的细胞分裂期相,并绘制其模式图。

2. 计算 SCE 的频率。观察时以一个染色体的染色单体为依据,每一个深染区界面为一次交换。中部出现的互换计为两个 SCE,端部出现互换为一个 SCE,着丝点的互换单独计算。

3. 本实验的材料掺入 BrdU 时为什么要在全黑的条件下培养?

4. 用大蒜、洋葱作试验材料,试验结果与蚕豆有何区别?为什么?

(邱奉同)

## 实验 10 染色体组型分析

### 【实验目的】

学习和掌握植物染色体组型分析的方法,了解染色体组型分析的意义,为进行细胞遗传学和遗传育种学的研究奠定基础。

### 【实验原理】

各种生物染色体的形态、结构和数目都是恒定的。大多数高等动植物是二倍体(diploid)。一个二倍体生物中配子所含有的全套染色体,称为一个染色体组(genome)。而染色体组在细胞分裂中期的表型称为染色体组型或称核型(karyotype),包括染色体数目(即基数)、形态、大小、着丝点位置及副缢痕、随体的有无等特征。

染色体组型分析就是通过对染色体标本和其照片进行测量、对比分析、配对、分组、排列,对组内各染色体的形态进行测量、描述,从而阐明生物染色体组成的过程。它在细胞遗传学、现代分类学、生物进化以及遗传育种学等研究中,是十分重要的研究手段。

进行染色体组型分析可以利用体细胞有丝分裂中期的染色体,也可以利用性母细胞减数分裂期的染色体。以利用前者的较多。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

大麦( $2n = 14$ )、黑麦( $2n = 14$ )、玉米( $2n = 20$ )、圆葱( $2n = 16$ )、蚕豆( $2n = 8$ )。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

显微镜、显微照相和冲洗、放大的全套设备,目镜测微尺、镜台测微尺、计算器、透明直尺、剪刀、镊子、直尺、圆规、铅笔、坐标纸、绘图纸、胶水以及制作染色体玻片标本所需要的其他用品。

##### (2) 药品

暗室冲印扩所需药品。

### 【实验步骤】

#### 1. 有丝分裂时期的染色体组型分析

### (1) 制作染色体玻片标本

利用有丝分裂中的染色体进行组型分析,通常是采用根尖细胞有丝分裂中期的染色体。因为这一时期的染色体具有明显的形态特征,便于进行分析。获得有丝分裂中期染色体玻片标本的方法,可参照实验 1 进行。

### (2) 选材与显微摄影

当染色体玻片标本制好后,于显微镜下选出 10 个中期分裂相中染色体数目完整、分散良好、无重叠、各条染色体处于同一平面,并且着色鲜明、形态清晰、着丝粒明显(如果染色体带有随体),随体能明显可见的细胞,进行显微照相。取清楚的底片放大成  $8\text{ cm} \times 10\text{ cm}$  左右的照片。

### (3) 测量

测量每条染色体的总长度及长臂长度和短臂长度。可采用两种方式。一是利用显微镜和测微尺对染色体制片标本进行直接测量,但事先要用台微尺对目微尺的单位长度进行标定,且仅对染色体长度较大的标本适合。二是对放大后的照片进行测量,先在每条染色体旁边用笔作临时标记,随测量随记录,包括每条染色体的绝对长度、长臂长度、短臂长度、随体有无等;对于有随体的染色体,随体的长度可以记入也可不记入染色体长度之内,但应注明。对于每条染色体的着丝粒应平分之二,记入两臂长度之内。如果染色体弯曲不能用直尺测量时,可以先用细线量取与染色体等长的长度,再用尺子量出线的相应长度。通常在显微镜下测量以  $\mu\text{m}$  为单位,在照片上测量以  $\text{mm}$  为单位。

### (4) 计算

根据测量结果,计算出每条染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数。

$$\text{相对长度} = \frac{\text{某染色体的长度}}{\text{染色体组内全部染色体总长度}} \times 100$$

$$\text{臂比} = \frac{\text{长臂长度}(q)}{\text{短臂长度}(p)}$$

$$\text{着丝粒指数} = \frac{\text{短臂长度}}{\text{该染色体的长度}} \times 100$$

### (5) 配对

根据测量数据,比较染色体的形状、大小、相对长度、臂比、着丝粒指数、副缢痕的有无及位置、随体的有无等特征,对照片上的染色体进行粗剪(即将各个染色体分别剪下)和同源染色体的配对。

### (6) 排列

将配对的染色体按由大到小的顺序进行排列并编号。对于等长的染色体,以短臂长的在前;有特殊标记(如随体)的染色体及性染色体排在最后。排列时,把各



对染色体的着丝粒排在一条直线上,短臂在上,长臂在下。

### (7) 分类

根据臂比值确定各染色体着丝粒位置,进而依照着丝粒的位置将染色体分为四类(表 1-13)。

表 1-13 根据臂比对染色体的分类

臂 比	染 色 体 类 型	代 表 符 号
1.0~1.7	中部着丝粒染色体	M
1.7~3.0	近中着丝粒染色体	SM
3.0~7.0	近端着丝粒染色体	ST
7.0 以上	端部着丝粒染色体	T

### (8) 剪贴

将已经粗剪过的每条染色体进行细剪,使染色体周围所留相纸相等,若染色体图像清晰可以不留余边,然后按排列顺序整齐地贴在硬纸板上。一般是硬纸板的上方贴一张未剪的完整照片,中间贴上已经剪出且按顺序配对排列的染色体,下方列表,最后写出实验材料及核型公式。

核型公式是以公式的形式将核型分析的结果和核型的主要特征予以表示,简明扼要,便于记忆和进行比较。其书写格式如下例:

芍药(*Paeonia eactiflora*):  $K = 2n = 2x = 10 = 6m + 2sm + 2st^{st}$

编 号	绝对长度	相对长度	短 臂	长 臂	臂 率	着丝粒指数	随 体	类 型
1								
2								
3								
4								
5								
:								
n								

### (9) 翻拍及绘图

将剪贴排列好的染色体组型图进行翻拍或描图成为染色体组型图。

高等植物属异源多倍体的种类较多,进行组型分析时,不完全根据染色体的大小进行排列,而应根据系统发育的来源进行分组,然后各组按大小进行编排。例如,普通小麦是异源六倍体,由三个物种的染色体在系统发育过程中组合形成。已知其染色体组为 AABBDD,因此应分成 AA、BB、DD 几组进行分析。

### 2. 减数分裂时期的染色体组型分析

利用减数分裂时期的染色体进行组型分析,通常是选择终变期或中期 I 细胞,

因为这时同源染色体已经联会,每一条染色体包含着4条染色单体即成为二价体,染色体个体形态明显,分散度好,具有稳定的测量长度、着丝粒位置、有无随体等特点,是染色体组型分析的良好时期。此外,许多植物在减数分裂时,在同一个花药中的细胞具有比较好的细胞分裂同步性,给染色体组型分析带来了方便。

玉米、百合、鸭跖草的花药,是利用减数分裂研究染色体组型较好的材料。新鲜固定的蚕豆、豌豆的花蕾也可以利用。本实验请同学们自选一种材料进行,其取材和制片方法参见“植物花粉母细胞减数分裂”实验,其他步骤同上。

### 【实验报告】

1. 完成一种作物的染色体组型分析图,包括染色体组型图、数据表和核型公式。
2. 通过查阅资料,谈谈染色体组型分析的意义。
3. 为什么要用相对长度来表示染色体的长度?

(赵建萍 张爱民)

## 实验 11 植物单倍体的诱发

### 【实验目的】

通过烟草花药培养了解和掌握花药培养诱导单倍体的原理和方法,了解单倍体育种的意义,培养学生无菌操作的能力和意识。

### 【实验原理】

随着植物组织培养技术的发展,大量的实验已证实了植物细胞具有全能性(totipotency)。所谓全能性是指植物体的任何一个细胞,在适当的条件下都具有发育成完整植株的能力。植物花粉是由花粉母细胞经过减数分裂形成的单倍体细胞,仍具有一套完整的染色体及控制所有性状发育的每一种基因,因此也可以发育成一个完整植株。花药培养就是利用植物组织培养技术,把发育到一定阶段的花药经过无菌操作接种在人工培养基上,以改变花药内花粉粒的发育程序,诱导其脱分化,并继续进行有丝分裂,然后经过胚状体或愈伤组织途径再分化为完整的单倍体植株。通过这种诱发单性生殖的方法,使植物或其杂交后的异质花粉粒长成单倍体植株,再经染色体加倍成纯系,然后选育新品种,这就是单倍体育种的理论根据。这种方法能够加快育种速度,提高选择效率,快速建立自交系。此外,单倍体诱导对于研究植物个体形态发生、遗传及变异规律等一系列问题都具有重要意义。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

##### (1) 培养基成分及其母液配制

普通烟草花药培养常用 H 培养基,其成分较多,含量要求严格。为了节省称

量时间,避免混乱,将培养基母液配制及其培养基制备列成表 1-14。

表 1-14 H 培养基(Bourgain 和 Nitsch 1967)

化 合 物	mg/L	化 合 物	mg/L
KNO <sub>3</sub>	950	肌醇	100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720	烟酸	5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	甘氨酸	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	盐酸硫胺素	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	166	盐酸吡多素	0.5
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	25	叶酸	0.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	生物素	0.05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	蔗糖	20 000
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	琼脂	8 000
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	pH	5.5

铁盐 7.45 g Na<sub>2</sub>EDTA(乙二胺四乙酸二钠)和 5.57 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 溶解于 1 L 水中,每 L 培养基取此液 5 ml。

注意,各种成分称量要准确,同一母液内的诸成分要分别溶解,依次混合,最后定容。各种母液必须严格地单瓶分装,贴上标签,写明药品名称、稀释倍数和配制日期,放入冰箱内保存备用。

### (2) 培养基配制

1) 按表中顺序和吸取量,分别吸取母液混合于容量瓶中,然后将蔗糖加适量水溶解后倒入,琼脂须加水加热溶解后倒入,用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调 pH,最后加水定容到所需容积,加热至沸。

2) 用量筒和漏斗将培养基趁热分装到培养瓶中,分装量根据培养瓶大小而定,一般 50 ml 培养瓶装 15~20 ml,100 ml 培养瓶装 30~35 ml。塞上棉塞,用牛皮纸包好封口,用橡皮筋扎紧,0.105 MPa 高压蒸气灭菌 20 min,然后平放冷却备用。

### (3) 器具包装灭菌

1) 所用玻璃器皿(如烧杯、培养皿、三角瓶、广口瓶等)应彻底清洗后用蒸馏水冲一次晾干或烤干,用牛皮纸包扎两层,同时用大三角瓶装适量蒸馏水和一包棉球,0.105 MPa 高压灭菌 20 min。

2) 金属器械(如镊子、刀片等)可在用前浸在 70%乙醇中,再在酒精灯火焰上灭菌,也可包扎后同玻璃器皿一起进行高压灭菌。

3) 超净工作台应擦干净,最后用新洁尔灭擦洗一次台面,用前打开紫外灯照射 30 min。如用接种箱,擦洗干净后,应在箱内用甲醛高锰酸钾(向甲醛内加入高锰酸钾)熏蒸,用前再用紫外灯照射 30 min。



#### (4) 实验材料的选择

烟草盛花期选取花萼与花冠等长的花蕾较好,此时的花药处于单核靠边期,是烟草花粉培养的适宜时期。为比较准确确定花粉发育时期,可在接种前用改良苯酚品红染色压片法镜检,以确定花粉发育时期与其相对应的花蕾外部形态。

### 2. 用具及药品

#### (1) 仪器用具

超净工作台(或无菌接种箱)、恒温培养室(或可带光照的培养箱)、显微镜、高压灭菌器、分析天平、药物天平、剪刀、镊子、容量瓶、移液管、三角瓶(50 ml 或 100 ml)、试剂瓶、酒精灯、烧杯、培养皿、纱布、脱脂棉、牛皮纸、橡皮筋、广泛试纸、磁力搅拌器、小型喷雾器。

#### (2) 药品及试剂

70%乙醇、0.1%升汞水溶液、1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH、新洁尔灭、高锰酸钾、甲醛、蒸馏水、秋水仙素、培养基诸成分(表 1-14)。

### 【实验步骤】

#### 1. 花粉植株的诱导

##### (1) 灭菌消毒

1) 将已准备好的培养基用喉头喷雾器在瓶壁表面喷洒 70%乙醇,然后放入超净工作台或接种箱,将已灭菌的器具用 70%乙醇喷洒后,去掉第一层包装纸,放于超净工作台上,打开紫外灯,照射 30 min。

2) 实验者要修剪指甲,肥皂水反复洗手,最后将手浸泡在 0.1%新洁尔灭溶液中 3~5 min,方能上台操作。

##### (2) 花药消毒

将花蕾剥去萼片,放在灭菌的烧杯中,加入 70%乙醇消毒 10 min,再换 0.2%升汞溶液消毒 8 min,用无菌水冲洗 2 次,把花蕾移入另一灭菌锅中,再用无菌水冲洗 2 次,倒去无菌水。

##### (3) 接种

用钟表镊子将花蕾的 1/3 部分去掉,用手轻捻下部,花药即露出,小心用枪式镊子将花药接种在培养基上,每瓶 10~15 个花药,分布要均匀。然后包扎好,在包装纸上写上接种花药的品种名称、接种日期及实验者姓名。

##### (4) 花药的培养

将花药瓶放于 27~28℃的恒温培养室内,并给以适当的光照(1 000~1 500 lx)。

##### (5) 观察记录

实验者应按一定时间间隔观察记录培养花药的变化情况:最初几天花药由绿渐变黄至褐色,体积稍增大,3 周后药室开裂,在裂开处可见乳黄色的胚状体出现,见光后很快变绿,而后逐渐发育成单倍体幼苗。

## 2. 烟草单倍体胚状体发育过程的观察

### (1) 实验时期

待花药培养初见黄色胚状体后,即可取材压片观察。

### (2) 压片

在无菌条件下,取一花药培养物(其余的可继续培养)置载玻片上,加一滴改良苯酚品红溶液,用镊子反复压挤花药,然后去净药壁残渣,覆一盖片,用拇指轻轻压片。

### (3) 观察

在显微镜下寻找两细胞期、四细胞期、八细胞期、多细胞期、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和具有明显子叶和胚根分化的胚状体。

## 3. 单倍体小苗的移瓶、壮苗

待花粉植株大量出现后,由于小苗很弱,须进一步壮苗培养。

### (1) 壮苗培养基(T培养基)的配制

T培养基的配制方法同H培养基,只是成分有所变化。其成分及含量如下(mg/L)。

硝酸铵( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1 900	氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	440
硝酸钾( $\text{KNO}_3$ )	1 650	蔗糖	10 000
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	370	琼脂	8 000

微量元素、铁盐浓度与H培养基相同,有机成分省去,pH 6.0。

### (2) 移瓶

将H培养基上的小苗分开,移入T培养基上,每瓶一株,在培养室内继续培养至小苗长出大量根系,植株健壮,真叶长出3~4片为宜(约20~25 d)。

## 4. 单倍体植株的鉴定与移栽

壮苗培养基中生长的单倍体小苗长出3~4片真叶,形成一定根系时,即可移入花盆或培养土壤中生长。入花盆时,可剪取幼嫩根尖进行固定,按实验2的方法压片鉴定染色体数目,同时与正常二倍体植株的形态比较,其主要区别特征如下。

特 征	叶片大小		花的大小		花丝与柱头	花药大小	气孔大小		染色体数目
	长	宽	长	宽			长	宽	
单倍体	稍短	窄	短	窄	花丝比柱头短	较少	短	窄	$n = 24$
二倍体	稍长	宽	长	宽	花丝比柱头长	较大	长	宽	$n = 48$

## 【实验报告】

### 1. 详细记录整个花药培养的过程。

2. 绘出胚状体发生的各个时期的图像。
3. 比较单倍体植株与二倍体植株的形态学和细胞学特征。

(张爱民)

## 实验 12 植物组织的培养

### 【实验目的】

1. 学习和掌握不同植物组织的培养方法和技术
2. 了解植物组织培养在生产实践中的意义

### 【实验原理】

植物体细胞组织培养具有理论上和应用上的意义。它是运用培养技术进行作物品种改良的新途径,同时又丰富了基础遗传学的内容。在体细胞杂交、染色体移植、DNA 注射以及 DNA 重组技术成为育种过程的常用手段之前,必须阐明离体培养的单细胞再生为有重要经济价值的单子叶植物的遗传控制机理。体细胞克隆变异是借助于离体培养细胞发生的随机遗传变异得到的。随机遗传变异以及染色体总量的变化(非整体、多倍体等)在培养细胞中常有发生。现在,微量遗传变化也在培养细胞中发现。总之,作物品种可以通过上述遗传变化而得以改良。

培养细胞必须通过诸如愈伤组织培养或悬浮培养,打乱细胞的生长周期,诱导体细胞克隆变异。培养植物所表现出的体细胞克隆变异与诱变时间呈正相关。

水稻的任何部位几乎都可用来诱导愈伤组织。外植体可以是胚乳、胚、成熟的种子、小穗、子房、根尖、茎尖或茎节。然而种子和小穗用得最多,因为愈伤组织诱导较为容易且效率较高。

茎尖分生组织通常位于茎的最尖端,是直径约 0.1 mm、长度约 0.25~0.3 mm 的圆形组织。茎尖分生组织最早在胚胎发育时期形成,并在植物整个营养生长期保持旺盛的细胞分裂功能。茎尖分生细胞的全能性是分生组织培养技术的基础。茎尖分生组织培养为植物的快速繁殖与传代提供了一条有效途径。重建植株在遗传成分上几乎完全等同于供体植株。因而,茎尖分生组织培养广泛应用于有花植物(如菊花等)的繁殖上,茎尖分生组织培养在生产无病植株尤其是脱病毒植株方面 also 具有重要意义。茎尖分生组织培养步骤可以以种子繁殖作物与营养繁殖作物两种类型分别进行实验。

植物的组织培养能够使根、茎、叶等器官再次发生,例如苜蓿的叶柄培养。胚胎不被看作是器官,因为这种结构是独立的,如它与亲本没有维管束的联系。



愈伤组织的器官发生或离体培养下的器官形成,均由一群分生细胞的产生所诱导。这群分生细胞在组织内部的因子影响下能够形成原基。激素能够诱导根、茎以及胚胎的发生。根的诱导是在芽形成后进行的。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

小麦未成熟胚、玉米的玉米穗、小麦种子和小穗、种子繁殖植物(如蚕豆、豌豆、大豆等)的茎尖、营养繁殖植物(如草莓、马铃薯、木薯等)的茎尖。苜蓿叶柄(或子叶)、五彩苏(锦紫苏)叶片、番茄叶片、矮牵牛花的茎段和杨树的茎段等。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

高压灭菌器、光照生化培养箱、调药刀、小钵、塑料盒、刀片、冰箱、磁力搅拌器、培养皿、吸水纸、超净工作台、立体显微镜、显微镜、解剖显微镜、解剖针、手术刀、镊子、小试管、铝箔、蜡带、三角瓶和烧杯等。

##### (2) 药品

0.52%、1.2%、2.5%、3%、50%的次氯酸钠溶液、蒸馏水、培养基(诱导愈伤组织培养基、MS、B5、SH - NAA、KS7951、BRVS<sub>2</sub> 等)、贮存液、激素贮存液、Hoagland 营养液、卡诺氏固定液、70%乙醇、醋酸洋红和 95%乙醇等。

注意:应该灭菌的用具和药品都应严格高压灭菌。

### 【实验步骤】

#### 1. 小麦未成熟胚培养

1) 取 4~6 种受精(开花)后 12~15 d 的不同基因型的颖果,用 0.52%次氯酸钠表面灭菌 5 min,无菌蒸馏水冲洗。

2) 调药刀将胚从种子中挤出,连同颖片一起接种在初始培养基的表面。幼胚通常不形成愈伤组织,而成熟胚将在此培养基中萌发。

3) 愈伤组织诱导。诱导愈伤组织培养基的组成成分如下。

大量元素(mg/L)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	$\text{KNO}_3$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1 650.0	440.0	27.8	37.3	1 900.0	370.0	170.0

微量元素(mg/L)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KI
0.025	22.3	8.6	6.2	0.025	0.25	0.83

有机成分(g/L)

蔗	糖	琼	脂
20.0		6.0	

生长调节剂(mg/L)

2,4-D	盐酸硫胺素	L-天冬酰胺
1	0.5	150

培养基调到 pH 5.8, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

4) 种进去的胚在 27℃, 16 h 光照(1 500 lx)的培养室中培养, 直到长出愈伤组织。然后将愈伤组织转接到附加 0.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的同种培养基中, 每 20 d 继代培养一次。

5) 记录每种培养基诱导出的愈伤组织的数目, 并观察愈伤组织的大小和颜色, 如 IB(小, 褐色)、IT(小, 半透明)、5B(大, 褐色)、5T(大, 半透明)。

6) 将愈伤组织分成三组:

第一组: 愈伤组织在诱导培养基中培养 20 d;

第二组: 愈伤组织在诱导培养基中培养 45 d;

第三组: 愈伤组织在诱导培养基中培养 90 d。

7) 将以上各组愈伤组织转入分化培养基中, 分化培养基的成分与愈伤组织诱导培养基成分基本相同, 只是 2,4-D 浓度降低到 0.1 mg/L。低水平的 2,4-D 促进茎叶发育, 但对根的发育稍有影响。

8) 将带有绿点和幼芽的愈伤组织转入不含 2,4-D 的愈伤组织诱导培养基中, 在 22℃, 12 h 光照(5 000 lx)下培养。

9) 当茎叶和根长成后(大约 21 d), 用自来水冲去再生植株上的琼脂, 然后移栽到装有碎石的小钵中。必要时用 Hoagland 营养液浇灌。将小钵放入有盖的塑料盒内 2 d 以保持较高的温度, 在以后的 3 d 逐渐打开盖子以适应自然生长环境。

10) 生长 30 d 后, 取下每个再生植株的根尖, 固定, 检查染色体的数目和可能出现的畸变。然后将植株转入装有土壤的小钵中, 在温室中培养。

11) 以种子发生的苗作对照, 观察记录再生植株的各种形态变异, 比较这三组材料以及每种基因型在形态和细胞学变异的频率和类型。作出结论。

12) 收集表现有体细胞克隆变异的再生植株的种子, 播种得到下一代( $R_1$  或  $SC_2$  世代)。观察是否有同样的变异出现。

2. 玉米的幼胚培养

1) 田间或温室培养的玉米品系授粉后 14~18 d 的玉米穗取下,切成 5~8 cm 的小段。用 2.5% 次氯酸钠溶液消毒,灭菌蒸馏水冲洗。将幼胚迅速切出,在 4℃ 下存放 12 h。

2) 将玉米粒从玉米穗上取下,取出其内的幼胚,用窄刀片刮去胚乳。将位于玉米粒基部的胚接种于固体培养基上,圆的盾片朝上,较平的胚轴面接触在愈伤组织诱导培养基上。

愈伤组织诱导培养基组成成分中,大量元素、微量元素和有机成分同小麦,维生素和激素(mg/L)如下。

2,4-D	烟 酸	VB <sub>6</sub>	甘氨酸	VB <sub>1</sub>	泛酸钙	L-天冬酰胺
2	1.3	0.25	7.7	0.25	0.25	1 980.0

培养基调到 pH 5.8, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

3) 接种的幼胚在 28℃, 16 h 光照下发育。盾片的反应以及胚的最佳大小随基因型的不同有显著的差别。在合适的培养条件下,3 周后愈伤组织即可诱导出。第三或第四周可将愈伤组织继代培养在同种培养基上,以保存愈伤组织。

4) 2,4-D 的量减少到 0.5 mg/L、0.1 mg/L、0 mg/L,将愈伤组织逐步转移到 2,4-D 水平降低的同种培养基上,以诱导芽的形成与幼苗的形态发生。

5) 当根长出,幼苗长到 4~5 cm 高时,洗去根部的琼脂,将幼苗转入装有土壤的花盆中。第一周用烧杯或塑料袋罩住幼苗,以后可逐渐移去。

6) 在幼苗移入土壤之前,收集根尖,在 4℃ 用饱和 8-羟基喹啉预处理 4 h 后,转入新鲜卡诺氏 A 液(3 份 95% 乙醇,1 份冰醋酸)在 24℃ 下固定 24 h。根尖在 -10℃、70% 乙醇中保存,用醋酸洋红染色,用压片法制片。统计中期细胞染色体数目。

7) 统计每种基因型诱导出的愈伤组织块数目以及再生苗数目,记录幼苗的形态变异,并作出结论。

8) 将表现出形态变异或细胞学变异的植株自交。把种子播种下去得到下一代(R<sub>1</sub> 或 SC<sub>2</sub> 代),这些变异能否传递给后代?

### 3. 水稻的体细胞组织培养

1) 收集几个品种的成熟种子,除去谷壳。选择健康植株的幼嫩小穗,从距地面 5~10 cm 高处切下。

2) 将谷粒用 95% 乙醇漂洗 3 s 以除去种子外表的蜡脂层。如果漂洗时间超过 10 s,种子就会死亡。

3) 将幼嫩的小穗浸泡在 70% 乙醇中 10 min,在通风橱内除去叶片。



1~1.5 cm长的幼嫩小穗是愈伤组织诱导的最佳时期。

4) 将种子放在烧杯内用流水冲洗 2~10 min,然后浸没在装有 70%乙醇的无菌培养皿内 5 min。

5) 除去乙醇,向培养皿内加入 3%次氯酸钠溶液。不时地振荡,摇动处理 45 min。

6) 将种子完全浸没在无菌水中漂洗。

7) 将种子和幼嫩小穗接种在加有生长素的 MS 培养基中以诱导愈伤组织。MS 培养基的组成以及附加成分如下,其中大量元素和微量元素同小麦。

有机成分(g/L)

水解酪蛋白	琼脂
0.5	6.0

生长调节物质(mg/L)

2,4-D	IAA	激动素
2	0.2	0.2

培养基调到 pH 5.8,0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

8) 将种子和幼嫩小穗在 27℃、黑暗中培养。约 4 周后,愈伤组织诱导出来。

9) 将愈伤组织转入再分化培养基。这种培养基是在 MS 基本培养基的基础上附加有 2 mg/L 激动素、0.2 mg/L IAA 和 800 mg/L 水解酪蛋白。愈伤组织在 27℃、8 h 光照(1600 lx)条件下培养。

10) 统计每一品种每一植株愈伤组织的诱导频率,比较基因型与不同植株的诱导率的差异。

11) 统计绿苗诱导频率。比较不同基因型以及不同外植体(如种子与幼嫩小穗)诱导率的差异。

12) 将愈伤组织每 3 周继代培养一次,共继代培养 4 次(3 周—6 周—9 周—12 周)。在每一继代周期之末,将愈伤组织分化培养。比较经继代培养的和未经继代培养的愈伤组织绿苗诱导率的差别。一般来讲,继代培养时间越长,绿苗诱导率越低,幼苗生长较弱,细胞学上的异常也会增加。

4. 种子繁殖植物(如蚕豆、豌豆、大豆等)的茎尖分生组织培养

1) 将种子放入 70%乙醇中漂洗 1 min,然后浸入装有 1.2%次氯酸钠溶液的烧杯中 15~20 min,不时用手或磁力搅拌器搅拌和振荡。

2) 用无菌蒸馏水彻底冲洗灭了菌的种子。

3) 将种子放入无菌的垫有一层滤纸或吸水棉的培养皿内使其萌发。

4) 种子一旦萌发(约 4~5 d),立即无菌切取长约 0.3~0.5 mm 的茎尖分生组织。

5) 分生组织的无菌分离是在放入过滤空气通风橱内的立体显微镜下进行。所有的仪器,包括手术刀、解剖针和镊子必须浸入 70%乙醇中消毒。解剖显微镜和载物台也必须用 70%乙醇消毒。

6) 在显微镜(10×或 20×)下用镊子夹住茎尖,用解剖针或解剖刀将外轮叶片一片一片地去掉,仅剩下分生组织圆锥体与一对叶原基。在距圆锥体尖端 0.3~0.5 mm处,用解剖刀切成“V”字形,将带有原形成层的组织切下,立即接种在装有 2.5 ml 固体培养基的小试管(10 mm×1.2 mm)中,用棉花塞住管口,在 24~28℃下培养。

7) 很多种类的分生组织均可培养在 MS 或 B5 培养基上。B5 培养基的组成如下。

#### 大量元素(mg/L)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	$\text{KNO}_3$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
134	150	27.8	37.3	2 500	370.0	150

#### 微量元素(mg/L)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KI
0.025	10	2	3	0.025	0.25	0.75

#### 维生素(mg/L)

烟 酸	$\text{VB}_6$	肌 醇	$\text{VB}_1$
1.0	1.0	100	10.0

#### 有机成分(g/L)

蔗 糖	琼 脂
20.0	6.0

#### 生长调节物质(mg/L)

2,4-D	激动素
0.1~1.0	0.1

培养基调到 pH 5.5, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

8) 各种植物茎尖分生组织培养的形态发生。

种 类	培养基	激素成分(μmol/L)	培 养 条 件	形态发生
豌豆( <i>Pisum sativum</i> )	B5	BA0.5	26℃/16 h	芽
豌豆	B5	BA0.5	白天 20℃,晚上 15℃,16 h 光照	芽
大豆( <i>Glycine max</i> )	MS	BA0.1+NAA1.0	26℃/16 h	植株
豇豆( <i>Vigna vulgaris</i> )	MS	BA0.001+NAA10	29℃/16 h	植株
菜豆( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	MS	BA5.0+NAA10	29℃/16 h	芽
花生( <i>Arachis hypogaea</i> )	MS	BA0.1+NAA1~10	29℃/16 h	植株
番茄( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	MS	BA,NAA0.1~1.0	26℃/16 h	植株

9) 一个学生选择一种作物进行分生组织培养。统计形态发生的类型以及频率,观察是否有形态学和细胞学的变异。在通常情况下,培养已经分化了的器官。分生组织是不会发生体细胞克隆变异或细胞学变异的。

5. 营养繁殖植物(如草莓、马铃薯、木薯等)的茎尖分生组织培养

以草莓(*Fragaria ananassa*)为实验材料,它是一种由匍匐茎繁殖的多年生作物。

1) 将草莓栽培在温室中的腐殖土、泥炭藓、蛭石(或沙子)(3:2:1)的混合物上。掐掉花朵以促进匍匐茎的生长。

2) 切取匍匐茎的茎尖(5 cm 长),用 1.2%次氯酸钠的 20%溶液(体积)灭菌蒸馏水冲洗 3 次。

3) 将茎尖分生组织切下(0.4~0.5 mm),培养在由琼脂固化的 MS 培养基,附加 1 μmol/L BA、1 μmol/L 吲哚丁酸以及 0.1 μmol/L GA<sub>3</sub>。培养条件为 26℃,16 h 4 000 lx光照以及 70%的湿度。

4) 约 3~4 周后,芽分化形成,将这些芽再培养在 MS 附加 10 μmol/L BA 的培养基中。以同样条件培养,可促进芽的增生。

5) 将扩增芽再培养在含有同样营养成分的培养基中。降低 BA(1.0 μmol/L)和 NAA(1.0 μmol/L)的水平或不加生长调节物质以促进根的形态发生。

每个学生用草莓进行分生组织培养实验。统计诱导出植株的频率以及可能发生的形态变异。

6. 苜蓿(*Medicago sativa*)叶柄(或子叶)的组织培养

1) 从生长在温室或生长箱(16 h 光照/d,4 000 lx)的健壮苜蓿植株上采集幼嫩叶柄。

2) 叶柄毁段(约 1 cm 长)的表面灭菌步骤如下:在 70%乙醇中浸泡 15 s,在 50%(容积/容积)次氯酸钠溶液中灭菌 5 min,在无菌蒸馏水中洗涤 2 次,每次洗涤 15 s。(叶柄用干酪布包裹,可用镊子从一种溶液转入另一种溶液。)

3) 培养基采用 SH-NAA 或 KS7951,每个培养皿接种 10 个叶柄切段。

① Shenk-Hildebrandt(SH)-NAA 培养基



贮 存 液	mol/L	贮 存 液	mol/L(g)
大量元素	50	激动素	5.0
微量元素 A	2.5	NAA	0.37
微量元素 B	2.5	肌醇	1 g
Fe-EDTA	2.0	蔗糖	30 g
维生素	1.0	琼脂	6 g

注意：先加水 400 ml，再依次加入各种成分，前一种成分充分溶解后再加入下一种，最后将体积定容到 1 L。将 pH 调到 5.8~6.0 后再添加琼脂。

② 贮存液

大量元素	质量/500 ml	维生素	质量/10 ml	微量元素 B	质量/100 ml
KNO <sub>3</sub>	25 g	VB <sub>1</sub>	50 mg	KI	40 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4 g	烟酸	50 mg	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	8 mg
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g	VB <sub>6</sub>	5 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2 g	微量元素 A	质量/100 ml	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4 mg
Fe-EDTA	质量/L	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	400 mg		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.75 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 mg		
Na <sub>2</sub> - EDTA	1.0 g	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40 mg		

以上两种溶质分别溶在 30 ml 水中。加热沸腾时将两种溶液混合。

③ 激素贮存液

激动素(先溶在 1 ml 0.5 mol/L HCl 中)	21.5 mg/L
2,4-D	100 mg/10 ml 95%乙醇
NAA(先溶在 95%乙醇中)	186.2 mg/L(1 mmol/L)

④ 配制 500 ml SH - NAA 培养基，装在 1 L 的瓶内，用铝箔封口，在 121℃、0.105 MPa 高压灭菌 20 min。

⑤ 待培养基冷却到 40℃，无菌分装到 100 mm×15 mm 培养皿或 50 ml 三角瓶中，封口作标记，放入冰箱保存。所有的培养皿需用蜡带封口，以备后用。

4) 将每个培养皿用蜡带封好，标上姓名、品种、植株号码以及日期。培养皿放在 27℃、16 h 光周期的培养箱内培养。

5) 愈伤组织大约在 4 周后出现。将这些愈伤组织转入诱导培养基(SH 培养基不附加 NAA，但含有 50 μmol/L 2,4 - D 和 5 μmol/L 激动素)培养 5 d。

6) 将愈伤组织分别转入 BL<sub>2</sub>Y 培养基或 SHAP 培养基(SH 培养基不含任何激素，但加有超过滤灭菌的 50 mmol/L 脯氨酸和 30 mmol/L 丙氨酸)，使植株再生。

7) 大约一个月后体细胞胚胎发生。当幼苗的根及枝条发育得较充分时，可将

它转入装有蛭石或湿砂子的小钵中。开始几天须盖上烧杯以保持湿度。

8) 当植株生根较困难时,用附加有 25  $\mu\text{mol/L}$  GA<sub>3</sub> 和 0.25  $\mu\text{mol/L}$  NAA 的 1/2SH 培养基和水浇灌。

9) 好的植株可移植栽到装有蛭石或湿沙子的小钵内,并在最初几天盖上烧杯,湿度应逐渐降低到与外界环境相同。这个过程至少需要 4~7 d。在移栽时,应避免将植株暴露在外界环境时间过长,否则植株将会萎蔫并且不可挽回。

7. 五彩苏(锦紫苏)叶片培养

这个实验中将从五彩苏的叶片外植体诱导芽以及根的形成,观察器官发生的诱导条件,以及变异的叶片通过营养繁殖的遗传传递。

1) 以五彩苏(*Coleus scutellarioides*)为材料,选择叶片大面积缺乏叶绿体的植株栽培。

2) 配制 BRVS<sub>2</sub> 培养基(pH 4.5)

在教师指导下,学生要自配贮存液,高压灭菌,将培养基分装在 125 ml 的三角瓶中(每瓶装培养基 50 ml)。

3) 摘取 10 片距茎尖第二和第三个节上的幼嫩叶片,用浸有 80%乙醇的棉花擦拭叶片。然后将叶片浸入 10%的次氯酸钠溶液灭菌 10 min。

4) 用无菌蒸馏水将叶片冲洗 3 次,将单张叶片放在垫有两层滤纸的培养皿上,用打孔器打成圆片。滤纸在这里起缓冲作用,并有助于打孔器对叶片组织的切割。

成 分	浓度/(mg/L)	成 分	浓度/(mg/L)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	333.0	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.009
KCl	41.6	VB <sub>1</sub>	0.337
KNO <sub>3</sub>	83.2	VB <sub>6</sub>	0.206
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	83.2	烟酸	0.123
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	83.2	泛酸钙	0.477
酒石酸铁盐	3.25	对氨基苯甲酸	0.137
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.286	NAA	0.5 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.181	苄氨基嘌呤	5.0 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.022	肌醇	216.0
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.008	蔗糖	2 000.0

5) 将圆叶片直接转入装有培养基的 125 ml 三角瓶中,每瓶接种一个外植体。静置培养而不需振荡。

6) 当芽形成后,将圆叶片外植体转入装有 200 ml BRVS<sub>2</sub> 固体培养基的 500 ml 三角瓶中(附加琼脂 0.45%,重量/体积)。这种培养基需加有 NAA(9  $\mu\text{g}/200\text{ ml}$  培养基)和苄氨基嘌呤(5  $\mu\text{g}/200\text{ ml}$  培养基)。

7) 在静置的液体培养条件下,圆叶片较易诱导出愈伤组织和芽。当芽形成后,将圆叶片转入固体培养基,有助于芽的继续发育。转移后,每个圆叶片能形成20个或更多的芽,并且根也会长出。大约5周后,当根和幼苗长到适当大小、茎长到10~15 cm长时,用水冲去根部的培养基,将苗取出移栽到土壤中。

8) 最初的外植体来自带有不同颜色斑纹的叶片。注意在再生植株中带有同样颜色斑纹的叶片类型。

9) 在五彩苏黄花叶片问题上,就遗传因子、维管束的抑制以及氨基酸的累加作用等方面,试解释黄花叶片变异的类型。

8. 番茄(*Lycopersicum esculenum*)叶片的组织培养以及植株的再生

1) 摘取靠近茎尖的幼嫩叶片,将叶片切成长方形作为外植体。

2) 用70%乙醇表面灭菌10 s,转入10%次氯酸钠溶液灭菌5 min,最后用无菌蒸馏水冲洗3次。

3) 将灭了菌的长方形叶片切成6 mm×8 mm大小。

4) 采用MS液体培养基,附加VB<sub>1</sub>(0.4 mg/L)、肌醇(100 mg/L)、蔗糖(30 g/L)、IAA(2 mg/L)、激动素(2 mg/L)。每只50 ml三角瓶中倒入15 ml液体培养基,用来培养外植体。

5) 在25℃,12 h光周期下培养。

6) 8~10 d后,愈伤组织即可诱导出来。

7) 根形成后,将材料转入加有IAA(4 mg/L)和激动素(4 mg/L)的同样的培养基中。大约4周后,茎叶即可长出。

8) 将培养物质转入不加任何外源植物激素的MS基本培养基以促进植株的形成。每隔3~4周需进行继代培养。

9) 每个学生用两个品种作材料进行培养。简述不同基因型对诱导的影响,以及可能出现的体细胞克隆变异和细胞学变异。

9. 矮牵牛花的茎段培养

1) 切取矮牵牛花(*Petunia inflata*)的1 cm长的节间茎段作外植体。

2) 配制培养基。

MS大量元素、蔗糖20 g/L、苄氨基嘌呤0.2 mg/L、琼脂0.7 g/L、Nitsch和Nitsch微量元素。

MnSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3 mg/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 mg/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L		

3) 将培养物放在24℃白天/17℃夜晚,16 h光周期下培养。

4) 大约培养2周后会出现芽。



5) 将芽切下转入 MS 基本培养基培养,芽即可发育成带根的完整植株。

6) 记录不同基因型的差异、诱导频率(小苗数/外植体数),以及可能出现的体细胞克隆变异和细胞学变异。

#### 10. 杨树的茎段培养

1) 取下杨树(*Populus* spp.)第一年生长的嫩枝。

2) 取 1~2 cm 长嫩枝节间茎段,沿着长度方向纵剖开。

3) 培养皿中垫一层激动素(2 mg/L)水溶液浸湿了的滤纸,将茎段外植体放在湿滤纸上,切口向上。

4) 几星期后,愈伤组织便诱导出,紧接着芽即长出。

#### 【实验报告】

植物组织培养的意义是什么?

(郭善利 周国利)

## 第三章 微生物遗传学

### 实验 13 粗糙链孢霉的杂交

#### 【实验目的】

1. 通过对粗糙链孢霉杂交产生的子囊孢子的观察、统计和分析,了解顺序四分子的遗传学分析方法。
2. 观察由于基因转换引起的异常分离现象,进一步验证分离和交换规律。
3. 学习并掌握重组值的计算方法及着丝粒作图的方法。

#### 【实验原理】

粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*,  $2n = 14$ )属于真菌门、子囊菌纲、球壳目、脉孢菌属,其菌丝体是单倍的( $n = 7$ ),基因型能够直接在表型上反映出来,而且生长快、易培养,有性生殖过程以及染色体的结构和功能类似于高等生物,一次杂交就可达到高等二倍体生物一次杂交和一次测交的目的,因而被广泛地用作遗传学研究的材料。

粗糙链孢霉的生殖方式有无性繁殖和有性繁殖两种。无性繁殖方式是菌丝体顶端断裂形成的分生孢子(分生孢子有只含一个核的小型分生孢子和含有多个核的大型分生孢子两种)或菌丝体的片段,经有丝分裂直接发育成菌丝体,菌丝体可再生成分生孢子,如此周而复始。

有性生殖可通过两种方式进行。其一是一种结合型菌株的分生孢子落在另一种结合型菌株的原子囊果的受精丝上,分生孢子的细胞核进入受精丝,形成异核体,经过大约7~10次的双核并裂(有丝分裂),最后两种接合型的核融合为合子核。另一种方式是两种不同结合型菌株的菌丝连接,进而发生核的融合。无论哪种方式形成的二倍体核(合子核),都随之进行减数分裂,形成4个单倍体的核,成为四分体。四分体再各自进行一次有丝分裂,结果使每个子囊中含有8个子囊孢子,30~40个子囊包被在一个黑色的子囊果里。子囊孢子经60℃处理30~60 min,便会发芽,长出菌丝,再度开始繁殖(图1-18)。

粗糙链孢霉的子囊孢子是单倍体细胞,由它发芽长成的菌丝体也是单倍体。所以一对等位基因决定的性状在杂交子代中就能分离。在粗糙链孢霉中,一次减数分裂产物包含在一个子囊中,所以很容易看到一次减数分裂所产生的四分体中一对基因的分离,从而直观地证明基因的分离。同时,由于一个子囊中间的空间很

小,8个子囊孢子依次紧密排列在其中(每个子囊的大小约为  $20\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ ,而每个子囊孢子大约  $17\sim 26\ \mu\text{m}$ ),就可以测定着丝粒距离并发现基因转变(gene conversion)。若两个亲代菌株有某一遗传性状的差异,那么杂交形成的每一个子囊孢子属于一种类型,4个子囊孢子属于另一种类型,它们的分离比例是  $1:1$ ,而且子囊

孢子按一定顺序排列。如果这一对等位基因与子囊孢子的颜色或形状有关,那么在显微镜下可以直接观察到子囊孢子的不同排列方式。

本实验用赖氨酸营养缺陷型( $\text{Lys}^-$ )与野生型( $\text{Lys}^+$ )杂交,得到的子囊孢子分离为4个黑的(+)和4个灰的(-)。黑的孢子是野生型;赖氨酸缺陷型孢子成熟迟,所以呈灰色。根据黑色孢子和灰色孢子在子囊中的排列顺序,可把子囊分为6种子囊类型:

子囊型(1): + + + + - - - -	} 第一次分裂分离
子囊型(2): - - - - + + + +	
子囊型(3): + + - - + + - -	} 第二次分裂分离
子囊型(4): - - + + - - + +	
子囊型(5): + + - - - - + +	
子囊型(6): - - + + + + - -	

子囊型(1)和(2)的产生如图1-19所示。第一次减数分裂( $\text{M}_1$ )时,带有 $\text{Lys}^+$ 的两条染色单体移向一极,而带有 $\text{Lys}^-$ 的两条染色单体移向另一极, $\text{Lys}^+/\text{Lys}^-$ 在第一次减数分裂时分离,称第一次分裂分离(first division segregation)。第二次减数分裂( $\text{M}_2$ )时,每一染色单体相互分开,形成四分体,顺序是++--或--++,再经过一次有丝分裂,成为子囊型(1)和(2)。形成这两种子囊型时,在着丝粒和基因对 $\text{Lys}^+/\text{Lys}^-$ 间未发生过交换,是第一次分裂分离子囊,也属于非交换型子囊。

子囊型(3)和(4)的形成如图1-20所示。由于 $\text{Lys}$ 基因与着丝粒间发生了一

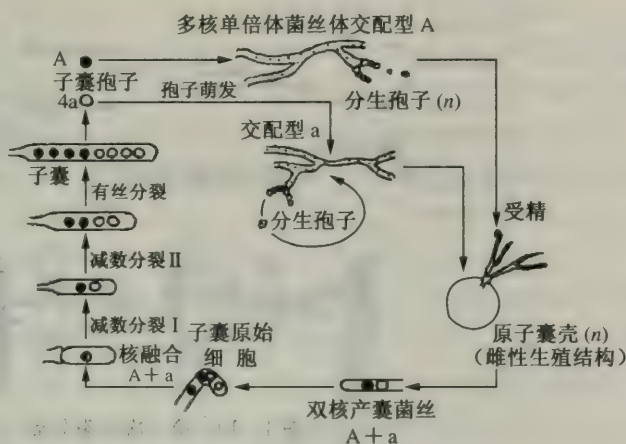


图 1-18 粗糙链孢霉的生活史

(引自梁彦生等 1989)



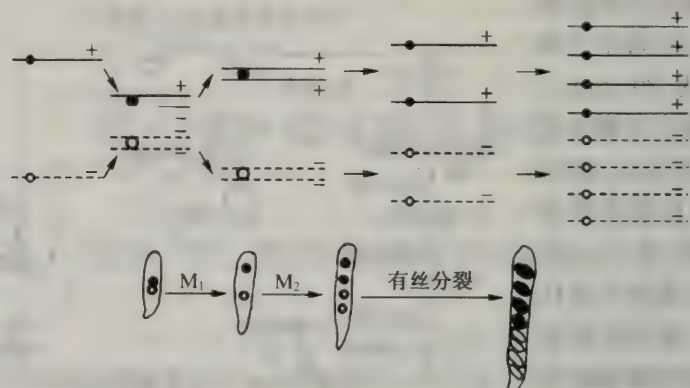


图 1-19 第一次分裂分离

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

个交换,  $\text{Lys}^+/\text{Lys}^-$  在第一次分裂时没有分离, 到第二次减数分裂 ( $M_2$ ) 时, 带有  $\text{Lys}^+$  的染色单体才和带有  $\text{Lys}^-$  的染色单体相互分开, 所以称为第二次分裂分离 (second division segregation)。然后再经一次有丝分裂, 形成 4 个孢子对, 顺序是 ++--++-- 或 --++--++。这是第二次分裂分离子囊。

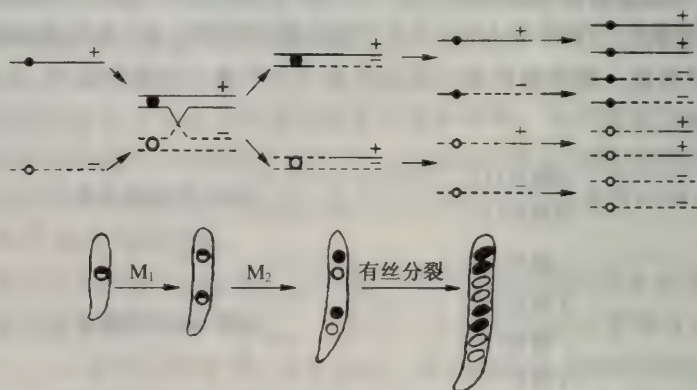


图 1-20 第二次分裂分离(一)

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

子囊型(5)和(6)的形成与(3)和(4)类似, 也是两个染色单体发生了交换, 不过交换不是发生在第二条染色单体与第三条染色单体之间, 而是发生在 1, 3 或 2, 4 两条染色单体之间(图 1-21)。

从上面的分析可知, 第二次分裂分离子囊的出现, 是由于有关基因和着丝粒之间发生了一次交换的结果, 所以, 子囊型(3)、(4)、(5)、(6)亦被称为交换型子囊。第二次分裂分离的子囊愈多, 则有关基因和着丝粒之间的距离愈远。因此, 由第二

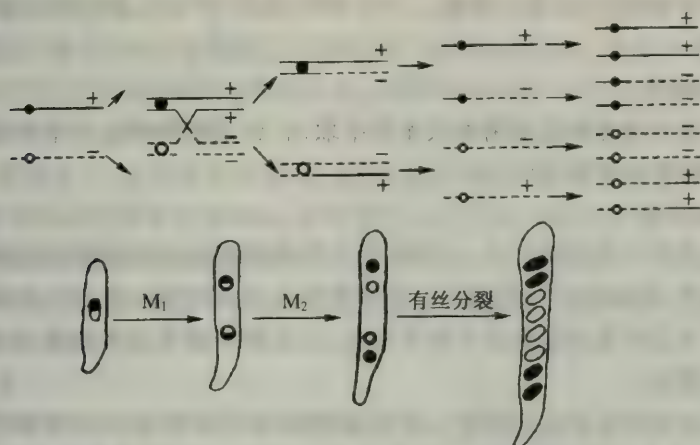


图 1-21 第二次分裂分离(二)

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

次分裂分离子囊的频度可以计算某一基因和着丝粒之间的距离,称为着丝粒距离。因为交换在两条染色单体之间发生而与另外两条染色单体无关,而每发生一次交换,产生一个第二次分裂分离子囊,所以求出第二次分裂分离子囊在所有子囊中所占的比例,再除以 2,即可决定某一基因与着丝粒之间的重组值。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

赖氨酸营养缺陷型( $Lys^-$ ),野生型( $Lys^+$ )。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 实验用具

显微镜、解剖镜、大试管或培养皿、接种针、解剖针、钟表镊子、酒精灯、三角瓶、载玻片、恒温培养箱、高压灭菌器。

##### (2) 药品

5%次氯酸钠。

##### (3) 培养基

1) 野生型用培养基——土豆培养基 新鲜土豆洗净去皮,切成黄豆粒大小块状,将 100 ml 水加热至沸,加入 2 g 琼脂溶解,然后分装试管,每管 2~3 ml,加入 4~5块土豆。

2) 缺陷型用培养基——补充培养基 将土豆培养基分装前加入 2 ml 赖氨酸水溶液,再分装,加土豆。

3) 杂交用培养基——玉米培养基 将玉米浸泡 24 h 后晾干,配制 2%的琼脂分装试管后,每管加入 2~3 粒玉米,再放 1 小片折叠的滤纸(长 3~4 cm)。

三种培养基配好后,塞上棉塞,0.056 MPa 灭菌 30 min,取出摆成斜面备用。

### 【实验步骤】

#### 1. 菌种活化

把野生型和营养缺陷型菌种从冰箱中取出,分别接种到土豆培养基和补充培养基上,活化、扩大培养,28℃ 3~5 d。

#### 2. 接种杂交

在无菌条件下或酒精灯旁,分别取野生型和赖氨酸营养缺陷型菌株的少许菌丝或分生孢子,接种到同一试管的玉米培养基上,贴好标签,于 25℃ 恒温箱中进行培养。5~7 d 后可见到棕色原子囊果出现,以后原子囊果变大变黑成为子囊果,2 周左右即可观察。

也可先在杂交培养基上接种一个亲本菌株,25℃ 培养 5~7 d 有原子囊果出现后,将另一亲本的分生孢子悬浮于无菌水中,加到形成原子囊果的培养物表面,使表面基本湿润即可,继续在 25℃ 下培养,1 d 后原子囊果即开始膨大,7 d 后即成熟可以观察。

#### 3. 子囊果的收集

向长有黑色子囊果的试管中加入少量无菌水,摇动片刻,倒入三角瓶中,加热煮沸 5 min,以防止分生孢子飞散。

#### 4. 压片

取一载玻片,加 1~2 滴 5% 次氯酸钠溶液,用接种针挑出子囊果放在载玻片上,然后覆一盖玻片,用拇指适当压片,将子囊果压破,或用镊子夹破子囊果。

#### 5. 观察统计

置载片于显微镜低倍镜下,找到子囊果破裂且大量子囊分散的视野,观察子囊孢子的颜色表型和在子囊中的排列顺序,统计结果填在下表中。

子囊类型	观察数	子囊类型	观察数
++++----		---++-++	
----++++)		---++++--	
++--++--			

#### 6. 计算 $Lys$ 基因的着丝粒距离

$$\text{着丝粒与 } Lys \text{ 基因间的重组值} = \frac{\text{第二次分裂分离子囊数}}{\text{观察到的子囊数总数}} \times \frac{1}{2} \times 100\%$$

$$Lys \text{ 基因的着丝粒距离} = \frac{\text{第二次分裂分离子囊数}}{\text{观察到的子囊数总数}} \times \frac{1}{2} \times 100$$



**【注意事项】**

1. 观察子囊孢子时,要掌握适当的时期。如果时间偏早,虽有子囊,但孢子均未成熟,无论野生型还是缺陷型都显白色;如果时间太迟,则所有的孢子都已成熟变为黑色,无法辨认两种性状。

2. 正常情况下,无论有无交换,野生型(黑)与缺陷型(白)的孢子的分离比均为 1:1,但有时出现异常的分离比,如子囊中的不同孢子比为 6:2(2:6)或 5:3(3:5),这是由于基因转变造成的。

3. 实验用过的器具要严格消毒灭菌,用过的实验材料经 5 min 煮沸灭杀后方可倒掉,以防污染环境。

**【实验报告】**

1. 记录所观察到的各种子囊类型,并计算出交换值。
2. 绘一显微镜下观察到的杂交子囊图。
3. 说明粗糙链孢霉的分离现象与高等动植物的基因分离有什么不同?
4. 简要解释计算重组值时为什么要除以 2。

(赵建萍)

## 实验 14 酵母菌的杂交

**【实验目的】**

1. 了解异宗配合型啤酒酵母的生活史。
2. 学习并加深理解自由组合定律。
3. 掌握酵母菌杂交的基本方法。

**【实验原理】**

酵母菌属于单细胞真菌,与其他真菌一样,可以以单倍体或二倍体状态存在。不论是单倍体或是二倍体,它的营养繁殖一般是通过不对称出芽方式进行。从分类学角度看,大多数酵母属于子囊菌类,一部分种类属于担子菌类。遗传学中经常采用的是一种子囊酵母——啤酒酵母(又称面包酵母, *Saccharomyces cerevisiae*)。

当两个不同接合型的啤酒酵母单倍体细胞(称为 a 或  $\alpha$  结合型)混合后可以融合形成二倍体细胞。将二倍体(a/ $\alpha$ )营养细胞放在孢子形成条件下,可以发生减数分裂,形成具有 4 个孢子的子囊,其中两个 a 型和两个  $\alpha$  型。每个孢子各具有一个单相的核,当子囊孢子接在营养培养基上约 6~8 h 后,便开始发芽,长成单倍体菌株。具有这样生活史的酵母菌称为异宗接合型(heterothallism)酵母。异宗接合型啤酒酵母的生活史如图 1-22。

现已知啤酒酵母共有 17 个连锁群 ( $n = 17$ )，啤酒酵母的  $a$  或  $\alpha$  两种接合型是受第三连锁群上的一对等位基因控制的。两种不同接合型的营养缺陷型的酵母单倍体菌株，在基本培养基上都不能形成菌落，只有它们杂交后形成二倍体杂种细胞，才能在基本培养基上生长。二倍体杂种细胞在形成子囊孢子过程中，会发生染色体重组，使产生的子囊孢子出现重组性状。

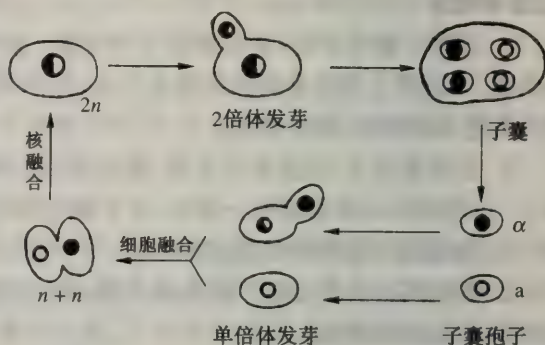


图 1-22 异宗接合型啤酒酵母的生活史

(引自刘祖洞, 江绍慧 1987)

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

啤酒酵母单倍体腺嘌呤缺陷型( $ade^-$ ), 接合型为  $a$ ; 啤酒酵母单倍体组氨酸缺陷型( $his^-$ ), 接合型为  $\alpha$ 。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 实验用具

试管、培养皿、离心管、离心机、石英砂、吸管、三角烧瓶、涂布棒。

##### (2) 药品

生理盐水(0.85 g NaCl 溶于 100 ml 蒸馏水中, 0.105 MPa 灭菌 15 min, 纤维素酶或蜗牛酶。

##### (3) 培养基

1) 完全液体培养基 蛋白胨 2 g、酵母浸出汁 1 g、葡萄糖 2 g、水 100 ml, pH 6.0, 0.056 MPa 灭菌 30 min。

2) 完全固体培养基 在完全液体培养基中加 2% 琼脂。

3) 基本液体培养基 葡萄糖 10 g、 $(NH_4)_2SO_4$  1 g、 $K_2HPO_4$  0.125 g、 $KH_2PO_4$  0.875 g、KI 母液 1 ml、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g、NaCl 0.1 g、微量元素母液 1 ml、维生素母液 1 ml、水 1 000 ml, pH 5.3, 0.056 MPa 灭菌 30 min。

KI 母液: 10 mg KI 于 100 ml 水中。

微量元素母液:  $H_3PO_4$  1 mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  7 mg、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1 mg、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  5 mg、水 100 ml。

维生素母液: 烟碱酸 40 mg、维生素  $B_1$  40 mg、肌醇 200 mg、核黄素 20 mg、生物素 0.2 mg、水 100 ml。

4) 基本固体培养基 在基本液体培养液中加 2% 琼脂。

5) 产孢子培养基  $\text{CH}_3\text{COONa}$  8.2 g、 $\text{KCl}$  1.86 g、吡多醇母液 1 ml、泛酸母液 1 ml、生物素母液 1 ml、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 ml。

吡多醇母液：20 ml 吡多醇/100 ml 水。

泛酸母液：20 mg 泛酸/100 ml 水。

生物素母液：2 mg 生物素/100 ml 水。

#### 6) 补充培养基

① 基本固体培养基 100 ml 加组氨酸 3.5 mg。

② 基本固体培养基 100 ml 加腺嘌呤 3 mg。

### 【实验步骤】

1. 取盛有完全固体培养基斜面的试管 4 支,把  $\text{ade}^-$  和  $\text{His}^-$  两菌种各接种在两只斜面上,30℃温箱中培养 24 h。

2. 用 5 ml 生理盐水洗下一支  $\text{ade}^-$  斜面上的菌,再倒入另一支  $\text{ade}^-$  试管中,洗下菌后倒入无菌离心管中。另取 5 ml 生理盐水洗下  $\text{His}^-$  2 支试管斜面的菌,倒入无菌离心管中。这样制成的菌液,浓度约  $10^8/\text{ml}$ 。

3. 两亲本菌液各吸 0.5 ml,放入 5 ml 完全液体培养基中,30℃静止培养 2 h。

4. 3 000 r/min 离心 3 min,30℃静止培养 0.5 h。

5. 倒去上清液,打匀管底菌块,再加入 6 ml 新鲜完全液体培养基,30℃培养过夜。

6. 离心,倒去上清液。再加 6 ml 新鲜完全液体培养基,洗一次,离心,倒去上清液。通过换用新鲜且营养丰富的培养基,以培养出好的新鲜细胞,并使不同接合型的细胞充分接触,形成合子,为产生孢子创造条件。

7. 将离心管中的沉淀菌接种在产孢子培养基斜面上,30℃培养 2~3 d。在显微镜下观察杂交后形成的子囊,可见其中有 4 个子囊孢子。

#### 8. 测定子囊孢子的表型推断其基因型

1) 在长有子囊的斜面上加基本培养液 2 ml,用接种环子囊刮下,倒入无菌离心管中。

2) 在 55~60℃的恒温水浴中加热 15 min,杀死酵母菌的营养体即单倍体细胞。离心,倒去上清液,加生理盐水到原体积,形成子囊悬液。

3) 把孢子悬液倒入消毒过的盛有石英砂的三角烧瓶各振荡 5 min,使子囊壳破碎,子囊孢子散出,成为子囊孢子悬液。也可用蜗牛酶充分处理子囊后,再用超声波处理使子囊孢子充分分散。蜗牛酶处理温度为 30~37℃,15~30 min。

4) 取打散的子囊孢子悬液 0.1 ml 涂布在完全培养基培养皿上,30℃培养 48 h。

5) 以上面的培养皿为原始培养皿,依次影印基本培养基、腺嘌呤补充培养基、组氨酸补充培养基、完全培养基,30℃培养 48 h。



6) 生长谱鉴定 ① 从原始培养皿上挑取各个已经初步鉴定的菌落,接种在完全培养基斜面上。同时接种在有 5 ml 液体完全培养基的离心管中,30℃ 培养 48 h。② 3 000 r/min 离心 3 min,倒去上清液,打匀沉淀,然后离心洗涤 3 次,最后加生理盐水至原体积。③ 吸取菌液 0.1 ml,移至灭过菌的空培养皿中。然后倒入融化后冷至 40~50℃ 的固体基本培养基,摇匀,待凝。各做 1 皿。④ 在每一培养皿的血底划分 4 格,两格放少量组氨酸结晶粉末,另两格放少量腺嘌呤结晶粉末。然后放到 30℃ 温箱培养 48 h。⑤ 观察生长情况,营养缺陷型菌株会在所需物质的周围长出来。如需两种物质,就只能在两种物质都扩散到的地方生长。

因为有关的 *ade* 和 *HisI* 基因属于不同的连锁群,是两对基因的自由组合,所以在实验结果中,单倍体基因型的比例为  $++:ade^-:HisI^-:ade^-HisI^- = 1:1:1:1$ 。单倍体菌株的表型比也应为  $1:1:1:1$ 。表型分离比直接反映了基因型的分离比。

### 【实验报告】

1. 将影印结果填入下表并计算菌落数(能生长用“+”表示,不能生长用“-”表示)。

	基本培养基	腺嘌呤补充培养基	组氨酸补充培养基	完全培养基	单倍体基因型
生长情况					
菌落数					

2. 分析解释实验结果。

(赵建萍)

## 实验 15 *E. coli* 杂交

### 【实验目的】

1. 了解 *E. coli* F 因子的性质及作用。
2. 掌握 *E. coli* 杂交、遗传重组的原理。
3. 学习 *E. coli* 杂交的方法。

### 【实验原理】

Hayes(1952)利用 *E. coli* 营养缺陷型和抗菌素抗性突变型进行正反杂交,发现了 *E. coli* 的致育因子(fertility factor,称 F 因子)。根据 F 因子的有无,*E. coli*可分为  $F^+$  和  $F^-$  两类。带有 F 因子的细菌表面具有一种称为性伞毛的毛

状突起,长 $1\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ 。性伞毛上有雄性专一噬菌体(MS2、K17、 $f_2$ 、QB等)的吸附位点,又和细菌的结合有关。F因子在细胞中能以两种状态存在,即游离状态或整合到寄主染色体的一定位置上,从而使带有F因子的细菌分为 $F^+$ 和Hfr两类菌株。

*E. coli* 杂交在 $F^+$ 和Hfr与 $F^-$ 菌株之间进行,通过细胞的暂时沟通,形成局部合子。在部分合子形成中,提供部分染色体或少数基因的菌株称为供体菌,而提供整个染色体的菌株称为受体菌。所以说, $F^+$ 和Hfr是供体菌, $F^-$ 是受体菌。

$F^+$ 和Hfr菌株都能与 $F^-$ 杂交,但两种杂交组合的结果不同,主要表现在:  
① Hfr和 $F^-$ 杂交后 $F^-$ 细菌性质不变,而 $F^+$ 和 $F^-$ 杂交后 $F^-$ 转变为 $F^+$ (约70%);  
②  $F^+$ 和 $F^-$ 细菌杂交重组频率 $10^{-6}$ ,而Hfr和 $F^-$ 杂交重组频率为前者的几百倍,故称为高频重组。究其原因主要是在 $F^+$ 中,F因子独立于染色体之外,呈游离状态,它的高频转移与供体菌染色体基因的转移没有关系;但在Hfr中,F因子是整合在染色体的一定部位上,转移时由F因子内的原点作起点,此时,F因子被割裂,F因子的一部分基因首先进入受体菌,另一些却留在了最后。在这类杂交中,供体染色体上的一些基因随原点很容易转移到受体菌中,但只有杂交过程足够长时,供体细胞中F因子的后一部分方能进入受体细胞,受体细胞才能由 $F^-$ 变为Hfr。

细菌杂交实验的方法有多种,我们介绍直接混合培养法和液体培养法。前者操作简单,适于确定两个菌株能否杂交或测定重组频率;后者适于细菌的基因定位。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

*E. coli* 的4个菌株,即K12Pro( $\lambda$ ) $F^+$ 、W1485His Ile  $F^+$ 、W1177Thr Leu Thi Xyl Gat Ara Mtl Mal Lac Str<sup>r</sup>( $\lambda$ ) $F^-$ 和Hfr C Met Trp。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 实验用具

灭菌的培养皿(9 cm)、三角瓶(150 ml)、吸管(1、5、10 ml)、离心管、试管等。

##### (2) 培养基

1) 基本培养基      Vogel 50 $\times$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g、柠檬酸 100 g、 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  175 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  500 g( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  644 g),配好后放入冰箱保存备用。此配好的培养基浓度为使用浓度的50倍。

将称好的药品分别溶解于670 ml蒸馏水中,待一种药品溶解后再放另一种药品,直至全部药品都溶解,然后加水定容到1 000 ml。

2) 平板用基本培养基      2 ml Vogel 50 $\times$ 、葡萄糖 2 g、琼脂 2 g、蒸馏水

98 ml, pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 30 min。

3) 液体完全培养基(肉汤培养基) 牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5 g、蒸馏水 100 ml, pH 7.2, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

4) 半固体培养基 琼脂 0.7~1 g、蒸馏水 100 ml, pH 7.0, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

### 【实验步骤】

#### 1. 菌液制备

1) 实验前 14~16 h, 从冰箱保存的菌种斜面挑取少量菌种转接于盛有 5 ml 完全液体培养基的三角瓶中, 每一菌株接一瓶, 置 37℃ 培养过夜。

2) 取出培养过夜的细菌, 在 W1177 一瓶中加入 5 ml 新鲜的完全培养基液, 摇匀后等量分为 2 瓶。其余 3 瓶分别用 5 ml 吸管各吸出 2.5 ml, 然后各加入 2.5 ml 新鲜完全培养液, 充分摇匀。各菌液均置 37℃ 恒温摇床继续培养 3~5 h。

3) 自温箱取出三角瓶, 分别倒入离心管, W1177 菌株倒两只离心管, 其余菌株各倒入一支离心管, 离心沉淀, 3 500 r/min, 离心 10 min。离心后, 弃去上清液, 加无菌水悬浮菌体, 同样方式离心洗涤 3 次, 最后加无菌水至原体积。

#### 2. 杂交(混合培养)

1) 取 12 支灭菌试管, 每支吸入 3 ml 经融化的半固体培养基, 保温在 45℃ 条件下。

2) 12 支试管分为三个杂交组合, 即 W1177 × K12Pro、W1177 × W1485、W1177 × HfrC。每个组合 4 支试管, 其中 2 支作为对照, 2 支作混合菌液杂交用。向对照组试管中吸加供体  $F^+$  或 Hfr 菌液 1 ml, 其余按杂交组合各吸加供体菌和受体菌 0.5 ml, 充分混匀。

3) 将各试管中含菌的半固体倒在有 Vogel 培养基的平板上, 摇匀待凝, 置 37℃ 条件下培养, 48 h 后观察。

### 【注意事项】

1. *E. coli* 中除了不同型细胞结合外, 同型细胞  $F^+$  与  $F^+$  和 Hfr 与 Hfr 也能接合, 但重组频率很低。这主要是由于 F 因子是细胞壁抗 F 原发生变化, 不同于 F 性菌毛的表面成分阻止了  $F^+$  与  $F^+$  细胞之间的杂交。

2. 带有 F 因子的 *E. coli* 有  $F^+$  和 Hfr 两类, 实际上并不是所有的 Hfr 都很稳定, 在许多 Hfr 群体中有回复子。在这些回复子中, F 因子不再整合到染色体上, 而是重新游离出来。重新游离的 F 因子往往带有细菌染色体上的基因, 如 *iac* 和 *gal* 等基因, 称之为  $F'$  因子。带有  $F'$  因子的菌株也能和  $F^-$  杂交。

3. 实验过程中的全部操作均应为无菌操作, 尽量避免杂菌污染, 用过和无用的菌液均应灭菌后再倒掉。



【实验报告】

1. 将实验结果填于下表,并对实验结果进行分析。

皿号	组合	重组子数			皿号	组合	对 照		
		W1177×K12pro	W1177×W1485	W1177×HfrC			W1485	HfrC	K12pro

2. 如何用 *E. coli* 杂交进行基因定位?

(赵建萍)

实验 16 细菌的局限性转导

【实验目的】

本实验利用噬菌体( $\lambda$ )专一性转导半乳糖发酵基因(*gal*)现象,说明局限性转导的基本原理,进一步证明 DNA 是遗传物质,学习并掌握转导实验的基本方法。

【实验原理】

转导是指以噬菌体作为媒介,将某一细胞(供体)的基因导入另一细胞(受体)的过程。转导可分为两大类:一是普遍性转导,即可转导供体细胞的任意一个基因;二是局限性转导,只能转导供体细胞的某些特定基因。转导现象的发现进一步说明 DNA 是遗传物质。目前转导已作为基因精细分析的常用方法。

本实验进行局限性转导,采用的供体菌为 *E. coli* 溶源性菌株 *E. coli*K<sub>12</sub>( $\lambda$ )*gal*<sup>+</sup>,由于噬菌体( $\lambda$ )与半乳糖发酵基因(*gal*)紧密连锁,所以能在细菌中专一性转移半乳糖发酵基因。当此细菌受紫外线照射后,噬菌体被诱发释放,并以一定的比例形成转导噬菌体(带有供体细菌的半乳糖发酵基因且具有转导能力的噬菌体)。转导噬菌体和受体细菌 *E. coli* 混合接触,带有供体菌 DNA 片段(外基因子)的转导噬菌体以一定的频率整合到寄主染色体上,使原来不能利用半乳糖的受体细胞变为能利用半乳糖的细菌。整个过程如图 1-23 所示。

【材料与用品】

1. 材料

供体菌株 *E. coli*K<sub>12</sub>( $\lambda$ )*gal*<sup>+</sup>,受体菌株 *E. coli*K<sub>12</sub>*Sgal*<sup>-</sup>。

2. 用具及药品

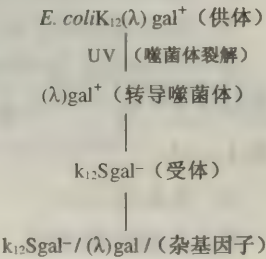


图 1-23

(周国利做)

### (1) 试验用具

培养皿(9 cm)、三角瓶(150 ml)、吸管(1、5、10 ml)、离心管、试管(15 cm×1.5 cm)、玻璃涂棒、离心机、水浴锅、紫外线照射箱、温箱、接种环。

### (2) 药品

氯仿、磷酸缓冲液( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, 蒸馏水 1 000 ml, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min)、生理盐水( $\text{NaCl}$  8.5 g, 蒸馏水 1 000 ml, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min)。

### (3) 培养基

1) 肉汤液体培养基 牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、 $\text{NaCl}$  0.5 g、蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

2) 加倍肉汤液体培养基(2E) 牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、 $\text{NaCl}$  0.5 g、蒸馏水 50 ml, pH 7.0~7.2, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

3) 肉汤半固体培养基 肉汤液体培养基中加 1% 的琼脂。

4) 肉汤固体培养基 肉汤液体培养基中加 2% 的琼脂。

5) 半乳糖 EMB 培养基 伊红 Y 0.4 g、美蓝 0.06 g、半乳糖 10 g、多胨 10 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2, 0.056 MPa 高压灭菌 25 min。

6) Vogel 50×基本培养基(浓缩 50 倍的基本培养基)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g、柠檬酸 100 g、 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  175 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  500 g、蒸馏水定容 1 000 ml, 配好后放冰箱备用。

7) 半乳糖基本固体培养基 2 ml Vogel 50×、半乳糖 2 g、优质琼脂粉 1.8 g、蒸馏水 98 ml, pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 25 min。

## 【实验步骤】

### 1. 噬菌体的诱导和裂解液的制备

#### (1) 供体菌的活化与培养

取一环供体菌,接种于盛有 5 ml 肉汤液体培养基的三角瓶中,在 37℃ 条件下培养 16 h 后,吸 0.5 ml 菌液接种于盛有 4.5 ml 肉汤液体培养基的三角瓶中,继续培养 4~6 h。

#### (2) 制备悬浮液

将三角瓶中菌液倒入离心管,以 3 500 r/min,离心 10 min,这样反复洗三次,制备成悬浮液。

#### (3) 诱导裂解

取悬浮液 3 ml 于培养皿中,经紫外线(UV)处理(15 W,距离 40 cm),诱导 10~20 s。

## (4) 避光培养

UV 处理后,加入 3 ml 2E 肉汤液体培养基,在 37℃ 条件下避光培养 2~3 h。

## (5) 制备裂解液

吸取培养物于离心管中,以 3 500 r/min,离心 10 min,吸取上清液,再加入 0.21 ml 氯仿(4~5 滴)剧烈振荡 30 s,静置 5 min,把上清液用无菌吸管转移到另一试管,就制成噬菌体( $\lambda$ )gal<sup>+</sup>的裂解液。

## 2. 噬菌体的效价测定

## (1) 受体菌的活化与培养

挑取一环受体菌,接种于盛有 5 ml 肉汤的离心管中,在 37℃ 条件下避光培养 16 h。然后从受体菌培养液中吸取 0.5 ml,放入盛有 4.5 ml 肉汤液体培养基的三角瓶中,继续培养 4~6 h,作指示菌用,剩余的菌液用于点滴法转导实验,随即放入冰箱中保存,供涂布转导实验用。

## (2) 双层培养测效价

1) 取已经熔化并于 45℃ 保温的半固体琼脂试管 4 支,每支加上上述的指示菌液 0.5 ml。

2) 取噬菌体裂解液 0.5 ml,放入盛有 4.5 ml 肉汤液体培养基的试管中,依次稀释到  $10^{-6}$  与  $10^{-7}$  倍。

3) 从稀释的  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍试管中分别吸取 0.5 ml 裂解液,加到有指示菌的半固体琼脂中(每个稀释做成 2 支),摇匀,分别倒入备好的肉汤固体培养皿中,摇匀,待凝固 37℃ 培养过夜,观察出现噬菌斑数,并计算噬菌体裂解液效价。

效价(单位/ml) = 两培养皿中平均斑数  $\times$  稀释倍数  $\times$  取样量折算数。

## 3. 转导

## (1) 点滴法

1) 取倒好的 EMB 培养基培养皿 2 只,在皿底用玻璃铅笔按图 1-24 的样子画好。

2) 取一满环受体菌,涂出一条菌带,共涂两条,在 37℃ 条件下培养 1.5 h。

3) 取出培养皿,在两个圆圈和四个方格处,各加一环噬菌体裂解液,两个圆圈作为对照,四个方格作为转导处理,培养 2 天,观察结果。

## (2) 涂布法

1) 取倒好的 EMB 培养基培养皿 6 只,其中 2 只加 0.1 ml 噬菌体裂解液,用于对照;2 只加 0.1 ml 受体菌,也用于对照,另 2 只加入噬菌体裂解液和受体菌液

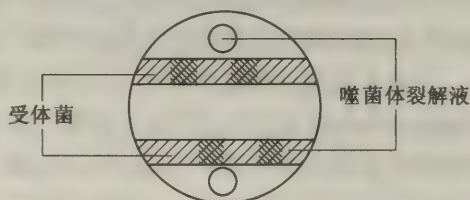


图 1-24 点滴转导涂皿法

(引自河北师范大学等 1982  
或傅焕延等 1987)



各0.05 ml。

2) 用玻璃涂棒将各皿上的菌液(或噬菌体裂解液)涂开,相同的两只培养皿用一根玻璃涂棒,在 37℃ 条件下培养 2 d,观察结果。

【实验报告】

1. 按下表要求观察记录数据,并分析实验结果。

噬菌体效价测定

噬菌体来源	裂解液稀释度	取样/ml	噬菌斑数/皿	噬菌斑数/ml
噬菌体( $\lambda$ )裂解液	$10^{-6}$	0.5		
	$10^{-7}$	0.5		

细菌转导结果记录表

转 导 实 验	点 滴 法			涂 布 法		
	受体菌	噬菌体裂解液	受体菌+噬菌体裂解液	受体菌	噬菌体裂解液	受体菌+噬菌体裂解液

菌落生长情况

菌落色泽

2. 在做局限性转导实验中应注意哪些问题?为什么?

(赵建萍)

## 第四章 数量和群体遗传学

### 实验 17 Hardy - Weinberg 遗传平衡定律的检验

#### 【实验目的】

通过对人群若干嗅阈的测量与分析,学会人类群体遗传调查的基本方法,了解中华民族各地方群体嗅觉相关基因的频率与分布,利用 Hardy - Weinberg 遗传平衡定律检验嗅觉基因是否处于遗传平衡状态。

#### 【实验原理】

嗅觉是由嗅上皮中嗅细胞的嗅觉受体接受气味分子的化学信号,通过神经传导在嗅觉中枢产生的反应。不同的气味分子与不同的嗅觉受体组合相互作用,产生出多种多样的嗅觉。各种嗅觉受体蛋白则是由不同的基因编码的。嗅觉受体基因的差异造成了不同个体、不同人群和不同种族之间嗅觉的遗传差异。疾病等其他因素也可以引起嗅觉差异。

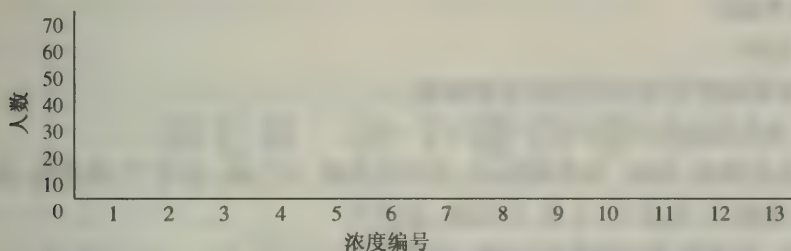
自从嗅觉受体基因首次被鉴定以来,这些基因及其编码的受体吸引了越来越多的注意。学者们估计,人类有将近 1 000 个嗅觉基因,分布于除 20 号和 Y 之外的所有染色体上,组成了基因组中最大的基因家族。其中约 72% 由于移框突变或终止突变等而成为假基因。嗅觉受体基因或类嗅觉受体基因在嗅上皮中大量表达,但也在其他不相关的组织如睾丸和心脏中表达。有学者认为,这反应了这些基因编码的蛋白质可能具有多种功能。

嗅觉受体基因的重要特征之一是在一个任意给定的嗅觉受体神经元中,只表达一对等位基因中的一个成员。排斥另一等位基因和其他基因的机制尚未完全明了。另一方面,一种受体却能以不同的亲和力与许多种不同的气味分子结合。由此推测,气味密码可能是一种组合密码,即一种特定的气味或气味混合物的刺激对所有的嗅觉细胞都有不同程度的激活。最近,正在用若干表达系统和配体与受体的分子模型相结合的方法,研究气味分子结合的机制。已经有证据显示,气味分子是通过与嗅觉受体的结合口袋(binding pocket)相互作用产生最初信号的。嗅觉受体的结合口袋与其他 G - 蛋白偶联受体相似,但其特定残基能更广泛地与气味配体相结合。

多种嗅觉差异可以通过简单的嗅觉测量实验检出。用一组不同浓度的嗅觉物质可以测量出不同个体对该物质的嗅觉敏感性差异,进而汇总成测试群体的嗅阈







乙醇嗅阈-人数分布图

根据阈值测定的峰谷原则,依据对乙醇嗅味的察觉阈,可以将被测群体分为两种类型:一类为敏感型,其阈值范围为第1~6号液;另一类为不敏感型,其阈值范围为第7~13号液。

依据对乙醇嗅味的识别阈,则可将被测群体分为三种类型:① 高度敏感型,阈值范围为第1~6号液;② 中度敏感型,阈值范围为第7~11号液;③ 不敏感型或称嗅盲型,阈值范围为第12~13号液。

#### 【实验报告】

如果对乙醇嗅味的识别能力由一对等位基因  $S-s$  控制,敏感为不完全显性( $S$ ),不敏感为隐性( $s$ ),设一群体有高敏型( $SS$ )76人、中敏型( $Ss$ )60人,不敏感型或嗅盲( $ss$ )10人。请计算出嗅盲率和基因频率,进一步用 Hardy - Weinberg 定律检验该群体是否处于遗传平衡状态。

(刘林德)

## 实验 18 环境因素对果蝇发生量的影响

#### 【实验目的】

学习测定果蝇发生量与温度和基因型之间的定量关系,加深理解基因型与环境相互作用的机理。

#### 【实验原理】

本实验中,教师提供给学生3或5个恒温培养箱,野生型和若干突变型纯种果蝇,学生经过实验小组讨论决定使用何种温差梯度、哪些果蝇类型和具体实验方案,整个实验过程是在完全开放的状态下进行的。实验过程中涉及定时记录果蝇的发生量,要求学生在一段时间内安排好实验与其他课程之间的关系,如实记录实验中出现的现象和问题,并做出自己的分析和判断。

**【材料与用品】**

## 1. 材料

普通果蝇野生型及不同突变型果蝇。

## 2. 用具及药品

恒温培养箱、烘箱、双筒解剖镜、双目显微镜、放大镜、温度计、培养瓶、麻醉瓶、白瓷板、载玻片、盖玻片、毛笔、白板纸、滤纸等。

乙醚、玉米粉、糖、酵母粉、丙酸、琼脂等。

**【实验步骤】**

## 1. 配制培养基

培养果蝇用的容器可以是粗指管或广口瓶,这些容器及其棉塞均需在实验前进行高温灭菌才能使用。可以按如下成分进行培养基配制:玉米粉 28 g、糖 22 g、琼脂 2.5 g、酵母粉 2.5 g、水 250 ml、丙酸 2 ml。

将玉米粉、糖、琼脂粉和水混合在容器内,在电炉上加热,不断用玻璃棒搅拌以免煮糊。煮沸后稍放置冷却,将酵母粉和丙酸加入,用玻璃棒搅拌均匀后分装到经高温灭菌的培养瓶内,塞上棉塞,置温箱内备用。

## 2. 恒温培养箱的温度设定及果蝇的培养

准备 3~5 个恒温培养箱,设定每个培养箱的温度使它们形成温度梯度,如 15℃、(18℃)、21℃、(24℃)、27℃ 或 15℃、(19℃)、23℃、(27℃)、31℃ 或 15℃、20℃、25℃ 等。向新配制培养基的瓶内转接不同基因型的、相同对数的成蝇(3~5 对),放置在不同温度的恒温培养箱内培养,定时观察记录果蝇的发育进程,统计不同温度下果蝇的发生量,记入表(1-15)。

表 1-15 果蝇发生量记录表

果蝇基因型	15℃	18℃	21℃	24℃	27℃
野生型					
突变型 1					
突变型 2					

## 3. 结果的统计与分析

分别设定纵坐标和横坐标的变量,绘制温度-果蝇发生量关系曲线、基因型果蝇发生量关系曲线,得出实验结论。

**【实验报告】**

## 1. 不同类型的果蝇在发生量上有什么差异?

2. 观察、比较所绘制的温度-果蝇发生量关系曲线、基因型果蝇发生量关系曲线,可以分别得出哪些结论?

(刘林德)

## 第五章 分子遗传学

### 实验 19 高等植物总 DNA 的提取和纯化

#### 【实验目的】

学习提取和纯化高等植物总 DNA 的方法,理解其原理。

#### 【实验原理】

植物细胞中的 DNA 主要存在于细胞核内,称为核 DNA 或染色体 DNA,单倍体细胞核 DNA 称为基因组 DNA(genomic DNA)。细胞质中也有少量的 DNA,主要分布在线粒体和叶绿体内,称为核外 DNA。细胞内的各种 DNA 称为总 DNA(total DNA)。高等植物的核 DNA 相对分子质量较大,与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白(DNP),在纯水或 1 mol/L 的 NaCl 溶液中溶解度较大,而不溶于有机溶剂。

提取和纯化 DNA 的关键是将 DNA 与蛋白质分开,且尽量减少 DNA 的降解。从提取原理上看植物总 DNA 的提取方法主要有两种,即 CTAB 法及 SDS 法,常用的为 SDS 法。SDS(十二烷基硫酸钠)是一种阴离子去垢剂,高浓度的 SDS 在较高温度(55~65℃)条件下裂解细胞,使染色体离析,蛋白质变性,使 DNA 从蛋白质上游离出来。然后通过提高盐浓度及降低温度使蛋白质及多糖杂质沉淀(最常用的是加入 5 mol/L 的 KAc 于冰上保温,在低温条件下 KAc 与蛋白质及多糖结合成不溶物),离心除去沉淀后,上清液中的 DNA 再用酚-氯仿-异戊醇混合液反复抽提,以去除 DNA 中的蛋白质,进行纯化。最后用等体积的异丙醇或二倍体积的无水乙醇沉淀水相中的 DNA。

SDS 法操作简单、温和,也可提取到相对分子质量较高的 DNA,但所得产物含糖类杂质较多。该方法所得的 DNA 样品也可直接用于 Southern 杂交,但在限制内切酶消化时需加大酶用量,并适当延长反应时间。需要说明的是,用该法提取的 DNA 如果因后继实验在纯度上要求而必须用氯化铯密度梯度离心纯化的话,那么提取时应用 Sarkosyl(十二烷基肌氨酸钠)代替 SDS,因为 Sarkosyl 能溶解在低浓度的氯化铯溶液中。

#### 【材料与用品】

##### 1. 材料

植物的根、茎、叶、愈伤组织等新鲜材料或冷冻干燥的材料。



**【用具和药品】****(1) 用具**

研钵和杵子、离心管、量筒、液氮、电热恒温水浴锅、冷冻离心机、高压灭菌锅、移液器、Eppendorf 管、吸管、枪头等。

**(2) 试剂**

提取缓冲液(100 mmol/L Tris. Cl(pH 8.0)、50 mmol/L EDTA(pH 8.0)、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L 巯基乙醇)、10% SDS、5 mol/L KAC、酚-氯仿-异戊醇混合液或 Tris 饱和酚、无菌水、异丙醇或无水乙醇。

**【实验步骤】**

- 1) 将提取缓冲液于 65℃ 预热。
- 2) 称取新鲜的植物材料 2~4 g, 研钵中加液氮迅速、充分研磨成细粉。
- 3) 把研磨好的粉末迅速转入 50 ml 离心管中, 加入 15 ml 提取缓冲液, 1 ml 10% SDS, 充分混匀, 65℃ 保温 20 min, 其间摇动 1~2 次。
- 4) 在离心管中加入 5 ml KAC, 混匀, 平衡, 冰浴放置 30 min 以上, 然后 6 000~7 500 r/min, 离心 15 min。
- 5) 取上清至另一离心管, 加入 5 ml 酚-氯仿-异戊醇混合液或加 5 ml Tris 饱和酚+5 ml CHCl<sub>3</sub> 混匀, 混匀后 4℃、6 000~7 500 r/min 离心 10 min。
- 6) 将上清液转移至另一离心管中, 加入 5 ml 氯仿, 混匀后, 4℃、6 000~7 500 r/min 离心 10 min。
- 7) 转移上清液至另一离心管中, 加入等体积-20℃ 预冷的异丙醇或二倍体积的无水乙醇, 轻轻颠倒混匀, -20℃, 30 min 静置至出现絮状物。
- 8) 用剪去前端尖部的大枪头吸出絮丝状 DNA 至 Eppendorf 管中, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 不能太干, 加入适量的 70% 乙醇, 轻轻摇动离心管, 弃上清。再加入 70% 乙醇, 重复上面操作 1~3 次。
- 9) 将沉淀吹干, 用 80~100 μl 无菌水加 2 μl RNase 溶解, 37℃, 2 h。4℃ 保存备用。

**【实验报告】**

1. 怎样初步检测提取的植物总 DNA 的质量?
2. 在提取植物总 DNA 的操作过程中应注意哪些问题?

(王淑芳)

## 实验 20 聚合酶链反应——PCR

**【实验目的】**

1. 学习和掌握 PCR 基因扩增的原理和操作方法。

## 2. 深刻理解 PCR 基因扩增技术在 DNA 操作中的重要性。

## 【实验原理】

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的原理类似于 DNA 的天然复制过程。在待扩增的 DNA 片段两侧和与其两侧互补的两个寡核苷酸引物,经变性、退火和延伸若干个循环后, DNA 扩增  $2^n$  倍(图 1-25)。

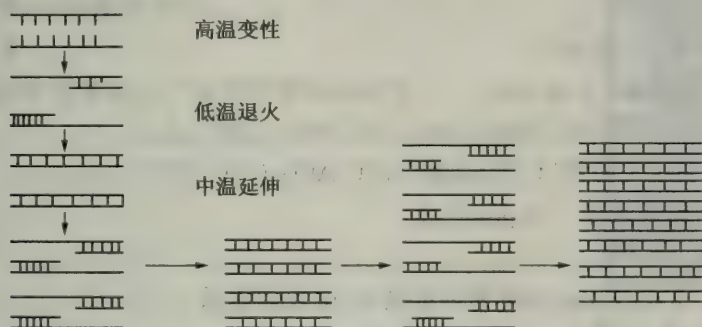


图 1-25

1) 变性: 加热使模板 DNA 在高温下( $94^{\circ}\text{C}$ )变性, 双链间的氢键断裂而形成两条单链, 即变性阶段。

2) 退火: 使溶液温度至  $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ , 模板 DNA 与引物按碱基配对原则互补结合, 即退火阶段。

3) 延伸: 溶液反应温度升至  $72^{\circ}\text{C}$ 。耐热 DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板, 在引物的引导下, 利用反应混合物中的 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP), 按  $5'\rightarrow 3'$  方向复制出互补 DNA, 即引物的延伸阶段。

上述 3 步为一个循环, 即高温变性、低温退火、中温延伸 3 个阶段。从理论上讲, 每经过一个循环, 样本中的 DNA 量应该增加一倍, 新形成的链又可成为新一轮循环的模板, 经过  $25\sim 30$  个循环后 DNA 可扩增  $10^6\sim 10^9$  倍。

典型的 PCR 反应体系由: DNA 模板、反应缓冲液、dNTP、 $\text{MgCl}_2$ 、两个合成的 DNA 引物、耐热 Tag 聚合酶等组分组成。

## 【材料与用品】

## 1. 材料

自选的 DNA 模板。

## 2. 用具及药品

## (1) 仪器

PCR 热循环仪、琼脂糖凝胶电泳系统。

## (2) 材料

4 种 dNTP、引物 1 和引物 2、Tag 聚合酶、琼脂糖、DNA 相对分子质量标准

物、吸头、小指管。

### (3) 试剂

1)  $10\times$ 缓冲液 500 mmol/LKCl、100 mmol/LTris·HCl(pH 8.3, 室温)、15 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.1% 明胶。

2)  $4\times$ dNTP 1 mmol/L dATP、1 mmol/L dCTP、1 mmol/L dGTP、1 mmol/L dTTP。

3) Tag 酶 1 U/ $\mu$ L。

4) DNA 模板 1 ng/ $\mu$ L。

5) 引物 1 5' GTG GGG GGC CCC AGG CAC CA 3'。

6) 引物 2 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC TTC 3'。

7) 引物溶液浓度 10 pmol/ $\mu$ l。

### 【实验步骤】

1. 在 0.5 ml Eppendorf 管内配制 25  $\mu$ l 反应体系

反应物	体积/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11~15
$10\times$ PCR 缓冲液	2.5
2.5 mmol/L dNTP	2.0
25 mmol/L $MgCl_2$	1.5(有时 $MgCl_2$ 与 $10\times$ PCR 缓冲液混在一起)
引物 1	1.0
引物 2	1.0
模板 DNA	1~5
Tag 酶	1

2. 扩增

1) 94℃预变性 5 min。

2) 94℃变性 1 min。

3) 52℃退火 1 min。

4) 72℃延伸 1 min。

5) 重复步骤 2)~4)25~35 次。

6) 72℃延伸 10 min。

注意,步骤 2)~4)中温度和时间的长短可根据扩增产物的不同变化而调整。

3. 琼脂胶电泳分析 PCR 结果

配制 1%琼脂糖凝胶,取 10  $\mu$ l 扩增产物电泳。保持恒流,调节电压,电压大小一般根据电泳槽两电极之间的距离定,如 5 V/cm。电泳结束后,用 EB 染色 15 min(或在配制琼脂糖凝胶时加入 EB),紫外灯下观察结果。



#### 4. 实验结果观察

本实验扩增片段的量(图 1-26)。

1. DNA 相对分子质量标准;

2. 10  $\mu$ l 样品;

3. 5  $\mu$ l 样品;

4. 对照(没有模板 DNA)。

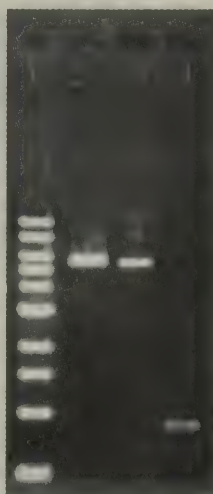


图 1-26 本实验扩增片段的量

#### 【实验报告】

简述 PCR 技术在分子遗传学领域的应用。

(贺继临)



## 第二部分

### 综合性实验

#### 实验 21 三点测验的基因定位方法

##### 【实验目的】

1. 了解利用三点测验法绘制遗传学图的原理和方法。
2. 学习并掌握实验结果的数据统计处理方法。

##### 【实验原理】

位于同一条染色体上的基因一般是随染色体一起传递的,即这些基因是连锁的。同源染色体上的基因之间会发生一定频度的交换,因此其连锁关系发生改变,使子代中出现一定数量的重组型。重组型出现的多少反映出基因间发生交换的频率的高低。基因在染色体上是呈直线排列的,基因间距离越远,其间发生交换的可能性就越大,即交换频率越高,反之则小,交换频率就低。也就是说基因间距离与交换频率有一定对应关系。基因图距就是通过重组值的测定而得到的。如果基因座位相距很近,重组率与交换率的值相等,可以直接把重组率的大小作为有关基因间的相对距离,把基因顺序地排列在染色体上,绘制出遗传连锁图。如果基因间相距较远,两个基因间往往发生两次以上的交换,如简单地把重组率看作交换率,那么交换率就会被低估,图距就会偏小。这时需要利用实验数据进行校正,以便正确估计图距。基因在染色体上的相对位置的确定除进行两个基因间的测交外,更常用的是三点测交法,即同时研究三个基因在染色体上的位置。如  $m$ 、 $sn^3$ 、 $w$  三个基因是连锁的(它们都在 X

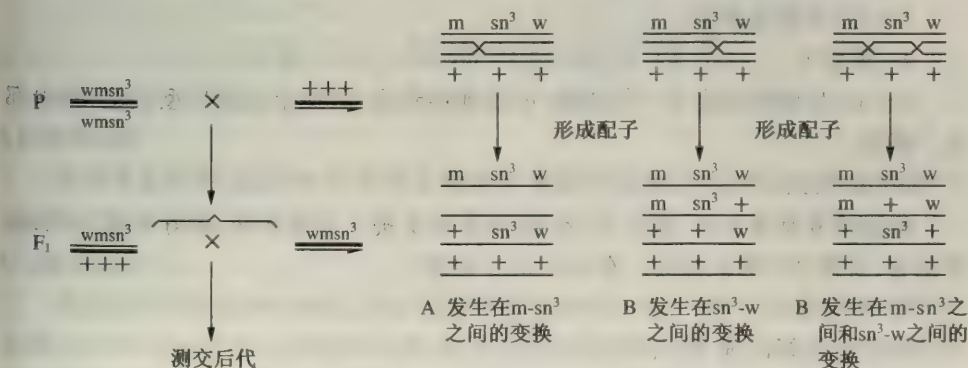


图 2-1 三点测交中获得测交后代的交配方式

图 2-2 在连锁的三基因杂种里总共可产生 8 种不同基因型的配子

(引自刘祖洞,江绍慧等 1987)



染色体上),要测定三个基因的相对位置可以用野生型果蝇(++++,表示三个相应的野生型基因)与三隐性果蝇( $msn^3w$ ,三个突变型基因)杂交,制成三因子杂种 $msn^3w/++++$ ,再用三隐性个体对雌性三因子杂种进行测交(图2-1),以测出三因子杂种在减数分裂中产生的配子类型和相应数目。由于基因间的交换,除产生亲本类型的2种配子外,还有6种重组型配子,因而在测交后代中有8种不同表型的果蝇出现(图2-2),这样,经过数据的统计和处理,一次试验就可以测出3个连锁基因的距离和顺序,这种方法就叫做三点测交或三点试验。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

黑腹果蝇品系:野生型果蝇(++)长翅、直刚毛、红眼;三隐性果蝇( $msn^3w$ )小翅、焦刚毛、白眼。三隐性果蝇( $wmsn^3$ )个体的眼睛是白色的( $w$ );翅膀比野生型的翅膀短些,翅仅长至腹端,称小翅( $m$ );刚毛是卷曲的,称焦刚毛或卷刚毛( $sn^3$ )。这三个基因都位于X染色体上,所以也可以在本实验中同时进行伴性遗传的实验观察。

#### 2. 用具及药品

同实验2。

### 【实验步骤】

#### 1. 选择处女蝇

收集三隐性个体的处女蝇,培养在培养瓶内,每瓶5~6只。

#### 2. 杂交

挑出野生型雄蝇放到处女蝇瓶中杂交,每瓶5~6只。贴好标签,注明杂交组合、日期及实验人姓名,在22~23℃中培养。

#### 3. 移去亲本

7~8 d后移去亲本。

#### 4. 观察 $F_1$

4~5 d后蛹孵化出子一代成蝇,可以观察到  $F_1$  雌蝇全是野生型表型,雄蝇都是三隐性。

#### 5. $F_1$ 互交

每瓶培养基移入  $F_1$  成虫5~8对(无需处女蝇),每组两瓶,贴好标签,注明杂交组合、日期及实验人姓名。在20~25℃培养。

#### 6. 移去 $F_1$

7~8 d后蛹出现,移去  $F_1$ 。

#### 7. 观察 $F_2$

4~5 d后  $F_2$  成蝇出现,开始观察。把  $F_2$  果蝇倒出麻醉,放在白瓷板上,用实体显微镜观察眼色、翅形、刚毛。各类果蝇分别计数。检查过的果蝇处死倒掉。隔

天检查记录一次,连续观察统计 4~5 次(8~10 d)。要求至少统计 200 只果蝇。

## 8. 实验结果与数据处理

### (1) 统计观察数

先写出所得到的  $F_2$  8 种表型,填上观察数,并计算总数(表 2-1)。

表 2-1  $F_2$  观察结果记录表

统计日期	$F_2$ 类 型						
合 计							
基因是否重组							

### (2) 填写“基因是否重组”一行

因为测交亲本是三隐性的,所以若基因间有交换,便可在表型上显示出来。因而从测交后代的表型便可推知某两个基因之间是否发生了重组。

### (3) 计算基因间的重组值。

## 【实验报告】

1. 统计实验结果,并绘出遗传学图和计算并发率、干涉。
2. 三点测交有什么优点?
3. 如果进行常染色体基因三点测交,在实验程序设计上与本实验有什么差别? 需要注意什么?

(姚志刚)

# 实验 22 植物有性杂交技术

## 【实验目的】

在对常见植物(农作物)的生育过程进行观察的基础上,尝试进行人工授粉完成植物的杂交过程。

## 【实验原理】

基因型不同的生物个体之间相互交配的过程叫杂交。植物的交配是通过传粉受精完成的,供给花粉的植株叫父本,接受花粉的植株叫母本。无论是自花授粉的植物还是异花授粉的植物,都可以通过控制授粉而进行人工有性杂交。人工有性杂交技术是遗传学研究的一种重要方法。

人工有性杂交技术是人工创造植物新的变异类型的最常用的方法,是现代

作物育种的有效方法之一。通过有性杂交方式可以重新组合父母本的基因,借以产生亲本各种性状的新组合,从中选择出人们所需要的基因型,从而培育出对人类有利的新品种或新物种。植物的有性杂交分为近缘杂交和远缘杂交,近缘杂交是指同一物种内不同基因型个体的杂交,远缘杂交是指包括亚种、种、属、科之间的杂交。品种间的杂交为同种内的近缘杂交,品种间具有相同的遗传物质基础,因此容易获得成功。远缘杂交可以扩大栽培植物的种质库,把有益的基因重新组合到新(品)种中,使之产生新的有益性状,并丰富植物的基因型。但远缘杂交由于存在着染色体的异源性,往往不易获得成功,出现杂种夭亡、结实率低甚至不育的情况。并且,杂种分离强烈,中间类型不稳定,因而增加了杂交的复杂性和困难。

本实验给出了常见的具有代表性的植物(农作物)如小麦、水稻和栽培棉的参考发育指标,为实验提供一定的基础知识,进而指导人工授粉,完成人工杂交过程。

### 1. 小麦的开花生物学

#### (1) 花器构造(图 2-3)

小麦为复穗状花序,由穗轴和若干小穗组成,小穗排成两行,相互交错着生在穗轴节片上,穗轴两端着生的小穗较小,且易不孕,中部小穗较大且易结实。每个小穗有 2 个护颖、几朵无柄小花,第一、第二朵小花发育较大、结实,上部小花较小,常因缺乏营养而不结实。小花有内外颖包被,花内有雄蕊 3 枚,雌蕊 1 枚。雄蕊分花丝、花药两部分,花丝很细,花药两裂,未成熟时为黄色。雌蕊分柱头、花柱、子房三部分,柱头成熟时呈羽状分叉,子房倒卵形,子房靠外颖的一侧下部有两片很小的鳞片,开花时吸水膨大,使内外颖张开。

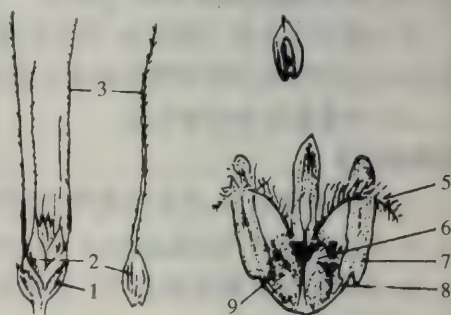


图 2-3 小麦花器的构造

1. 护颖; 2. 外颖; 3. 芒; 4. 内颖; 5. 柱头;  
6. 子房; 7. 花药; 8. 花丝; 9. 鳞片

(引自邱奉同, 刘林德 1992)

#### (2) 开花习性

小麦在抽穗 3~5 d 即开始开花,一天中有两个开花高峰期,分别在上午和下午,各地时间不一,如北京地区为上午 9~11 时,下午 3~4 时。其开花顺序是:就全株来说,主茎穗的花先开,然后按分蘖的先后顺序开花;就一穗来说,中部的 3~5 个小穗先开花,渐次向上部和基部的小穗发展;每个小穗的第一小花先开,然后是第二、第三朵花开放。一朵花从开到闭的时间约为 10~30 min,一个穗子的花期约 5~7 d,通常在第三、第四天花最多,为盛花期。

小麦开花受温度、湿度影响较大。开花的最低温度为 9~11℃,最适温度为 18~22℃。温度超过 30℃、雨水过多、日照不足,均对开花不利,尤其是高温干燥,不仅会



缩短开花时间,降低花粉和柱头的生活力,而且会破坏受精过程的正常进行。

### (3) 授粉与受精过程

小麦是自花授粉作物,授粉后外颖、内颖就闭合起来,如果没有授粉,内、外颖则不关闭,一直处于开张状态。有的小麦品种闭颖授粉,即不待颖张开即行授粉。柱头在正常情况下保持受精能力时间较长,可达7~8 d,不过一般在3~4 d后生活力即行降低。花粉保持生活力的时间较短,在散粉半小时后即由鲜黄色变为深黄色,这时就有一定数量的花粉死亡,因此,延迟授粉或用不新鲜的花粉授粉,结实率就会降低。

## 2. 水稻的开花生物学

### (1) 花器构造

稻穗属圆锥花序,穗中央为主轴、主轴上生枝梗,枝梗上生小枝梗,小枝梗上生小穗;小穗由一个颖花组成,颖花有花柄(图2-4)。小穗有护颖、副护颖各2个,护颖上有毛、较硬。花的内、外颖长度相等,外颖有芒或无芒。外颖基部的内侧有一对卵圆形肉质物,称为浆片(或称鳞片),浆片吸水膨胀促使内、外颖张开而开花。雌、雄蕊位于内、外颖之中。雌蕊分柱头、花柱和子房三部分。子房卵形,花柱顶端发育成两个羽毛状的柱头(图2-5)。雄蕊6个,每3个排成一列,分两组着生于子房基部。每个雄蕊由花丝和花药组成,花丝细长,花药为“丁”字形,分4室。

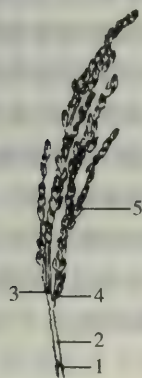


图2-4 稻穗的构造

1. 穗节;2. 穗轴;3. 第一枝梗;  
4. 第二枝梗;5. 颖花

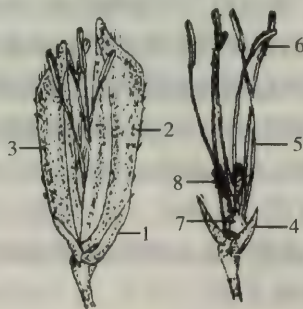


图2-5 稻花的构造

1. 护颖;2. 内颖;3. 外颖;4. 鳞片;  
5. 花丝;6. 花药;7. 子房;8. 柱头

(引自邱奉同,刘林德 1992)

### (2) 开花习性

稻穗从叶鞘抽出后的当天或1~2 d就可以开花。开花时浆片膨大,内外颖张开,花药吐出颖外。约经30 min,花丝凋萎,浆片因水分蒸发失水而收缩,内外颖重新关闭。水稻开花受环境影响很大,气温20~30℃,相对湿度70%~80%是水稻开花

最适宜的外界条件。开花的顺序是：整个稻穗，主轴上的花先开，其次是上部的枝梗，从上到下依次开花；同一枝梗上，顶部的颖花先开，基部的颖花第二开放，然后由下而上渐次开放。从开颖到闭颖，一朵花一般需经历 1.5~2 h(籼稻短、粳稻长)。整个稻穗开花所需天数因品种、气候及穗子大小而有所不同，一般自开始开花到全穗开完，早稻需 5 d，中稻需 6~7 d，晚稻需 8 d 左右。早稻和中稻在穗露出叶鞘的当天就有部分小穗开花，而以第二和第三天开花最盛，且开花较为集中，以后逐渐减少。晚稻在穗露出叶鞘的第二天才开花，以 4~5 d 为最盛，开花比较分散。每天开花的时间因气候、品种而异，早、中稻开花比较早，晚稻比较迟。正常情况下，一般上午 9 点开始开花，中午开花最盛，下午 4 时以后开花较少(个别品种例外)。

### (3) 授粉与受精过程

水稻为自花授粉作物，花药散粉后，落在柱头上的花粉在 1.5 min 后即可萌发，大约在开花后 1.5~4 h 便可完成受精过程。花粉在自然条件下放置 3 min 就有 50% 左右失去生活力，5 min 后几乎全部失去生活力，10~15 min 后再授粉，则已完全不能结实。柱头的生活力可维持到去雄后的第六天，但一般在去雄后 1~2 d 内授粉效果最好。

## 3. 棉花的开花生物学

### (1) 花器的构造

棉花(*Gossypium hirsutum*)的花为单生完全花，由花萼、花冠、雄蕊和雌蕊组成，花的外层有苞叶。苞叶三角形，基部联合或分离。陆地棉苞叶茎部外面凹处有蜜腺三个。花冠由 5 片花瓣组成，开花前相互重叠为螺旋形，花瓣大小和颜色因棉种而异，有的棉种或品种花瓣基部有红芯。雄蕊由花丝和花药组成。花丝基部连合成管状，与冠基部连接，套于雌蕊外而成为雄蕊管。花药 60~90 枚或更多，为单室，每个花药内约有 100~200 粒花粉。花粉粒呈球形，表面有小刺。雌蕊由柱头、花柱和子房三部分组成。子房 3~5 室或更多，每室着生胚珠 7~11 个，受精后每一胚珠发育成一枚种子。花柱细长，顶端为柱头。柱头有纵棱，常扭曲，多露出雄蕊管外，表面密生乳头状突起，开花时分泌黏液，便于黏着花粉。

### (2) 开花习性

棉花多在上午 8:00~10:00 开花，气温高、气候干燥时开花提早，温度低、阴雨天时开花延迟。棉花开花有一定顺序：由下而上，由内而外，沿果枝呈螺旋形进行。一般情况下，相邻果枝同节花蕾开花时间相隔 2~4 d，同一果枝相邻果节的花蕾开花时间约相隔 5~8 d。开花时间相隔的天数因温度、养分和棉株长势而有增减。一朵花从花冠露出苞叶至开放约经 12~16 h。开花 3 d 以后，花萼、花冠连同雄蕊管、花柱与柱头从子房上一起脱落下来。

### (3) 授粉与受精

棉花是常异花授粉作物。棉花的花冠张开时，雌雄两性配子已发育成熟。花



药在开花的前后或同时开裂散粉。在自然条件下,花粉生活力最强的时间是10:00~14:00,以后生活力显著减弱,到第二天上午即丧失生活力。柱头生活力维持的时间稍久,但也不超过第二天上午。花粉落到柱头上后,经1 h左右即开始萌发,8 h后花粉管即到达子房,20~30 h完成受精作用。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

小麦、水稻、陆地棉各两个品种。

#### 2. 用具与药品

普通热水瓶、温度计、放大镜、镊子、剪刀、大头针、回形针、半透明玻璃纸袋(4 cm×10 cm)、黑纸袋、纸牌、蜡管、棉线、毛笔、铅笔、70%乙醇。

### 【实验步骤】

#### 1. 小麦人工杂交的步骤及方法

##### (1) 选穗

选择生长健壮、发育良好、具有本品种典型特征的主茎穗作母本。为保证去雄后第二天或第三天能及时授粉,并获得较高的结实率,所选用植株的主茎穗抽出剑叶叶鞘约半寸较为适宜,气温较高或后期抽穗的可适当提早。

##### (2) 检查花药

用镊子小心打开中部两侧的小花,查看其花药,花药呈青色微透黄者为好。花药过嫩,去雄时易损伤花器;花药过老,去雄时花粉囊易裂,散出花粉发生自交。不过,去雄的穗子宁可嫩一点,不可过老。

##### (3) 整穗

在当选植株的主茎穗上,先用镊子或剪刀摘去上部和基部发育不好的小穗,仅保留中部10个小穗(两边各5个,共5对),而留下的小穗也只选取第一和第二花,其余的小花一律用镊子夹除。若有芒品种,则应从基部将芒剪去,以便操作。

##### (4) 去雄

为避免自交,必须及时除去母本植株花中的花药。操作时用左手大拇指和中指捏住穗子,食指轻压花颖的顶端,内、外颖即被分开,形成一裂口,然后用右手合紧镊子插入裂口,再略微放松,小心地将三枚花药镊出。注意不要刺破花药、损伤柱头及颖片,若不慎刺破花药则须将此花摘除,同时用70%乙醇浸洗镊子尖,以免造成人为的自花授粉。去雄的顺序是从下部小穗开始依次向上,做完一侧再做另一侧,避免遗漏。如发现小花中花药已有自然成熟开裂的,则应另换一穗。全部去雄完毕后要逐个检查一遍,做到去雄彻底,防止遗漏。检查时可用镊子分开两朵小花迎着阳光透视小花,即可看出小花中有无遗漏花药。去雄干净后,在此穗上套上透明纸袋,纸袋开口沿穗轴折合,用大头针别住,注意不要别住剑叶。然后在穗基节基部挂上纸牌,用铅笔写明母本名称和去雄日期。



### (5) 采集花粉

选取发育良好、正值开花期的父本植株,用镊子轻轻分开穗中部小花的内、外颖,从中小心地取出尚未开裂的花药(金黄色饱满的花药)两个,或采集刚开放小花的花粉。为能多采集花粉,也可以对已有数朵小花开放的穗子,用手轻轻摩擦几次,人为刺激其开花,把折叠好的“授粉纸”托在下面,轻敲麦穗,即能采到大量花粉。采集时应注意,使用的容器要光滑,不要使花粉遭受高温及日光长久暴晒,应当随采集随授粉,以免花粉活力降低或丧失生活力,影响受精结实。如发现花粉成团,则不能使用。

### (6) 授粉

#### 1) 裂颖授粉法

去雄花朵的柱头呈羽毛状分叉时,用手轻轻抚摸,颖片自行张开,这时即可授粉。授粉时间一般在去雄后的第二天上午8时(露水已干)以后,或下午3时以后进行。如遇阴雨天,温度低,可在去雄后3~4 d内授粉。授粉时先取下母本穗子上的隔离袋,由下向上依次用镊子在每朵小花里投入略微压破了的花药一个,或用镊子蘸少量花粉撒在柱头上,但须注意勿伤柱头及颖片,授完一边之后再给另一边的花授粉,全部授粉完毕再套上隔离袋,用大头针封好,并在所挂纸牌上填写父本名称及授粉日期,同时剪去纸牌下方一角,作为已授粉的标志,以便检查。更换授粉品种时,不能忘记换用授粉纸和用酒精浸洗镊子,杀死沾在上面的花粉。

#### 2) 捻穗授粉法

母本去雄后,把每只小花的颖片剪去 $1/4 \sim 1/3$ ,使上部露一小口,但应注意不要损伤柱头。而后用长约15 cm两头都不封口的隔离纸袋套住全穗,上下端都褶皱好,分别用大头针别住,授粉时把选好的父本穗在每朵小花顶端剪一小口,再用手摩擦几次,待有花药从颖片伸出,立即打开母本穗上的隔离袋的上口,把父本穗倒插入袋,在母本穗上凌空捻几次,让花粉落在柱头上,移去父本穗或将父本穗留在袋内,用大头针重新封上纸袋上口,填写纸牌,即完成授粉。此法省工省时、操作简便,只是结果率低,一般在杂交工作量大时采用。

### (7) 受精情况检查

授粉后1~2 h,小麦花粉粒就开始在柱头上萌发,约经40多小时就可以受精。在授粉后的第三、第四天可以打开套袋,检查子房膨大情况。若子房膨大,内、外颖合拢,说明已经受精;如果内、外颖仍然开张,子房不见膨大,说明未能受精。受精后一般不需要继续隔离,可以除去套袋。但为了防止意外和收获时易于辨认,可以不去套袋,到收获时连同母本麦穗一起取回。

### (8) 收获与储藏

去雄及人工授粉后,母本麦穗上结出的种子就是杂交种子。成熟后按组合收获,同一组合的杂交穗剪下后放在一起,脱粒后装在同一个纸袋里,写明组合名称、

种子粒数,置阴凉干燥处保存。

## 2. 水稻人工杂交步骤及方法

### (1) 选株和整穗

选取生长健壮,发育良好的植株做母本,剪去上部和基部枝梗上的小穗,再选出其中已抽出  $1/3 \sim 2/3$  的单穗,把开花的或当天不能开花的颖花剪掉,留下花丝伸长,花药将顶内颖的中部颖花  $20 \sim 30$  个。

### (2) 去雄

水稻的去雄方法有三种。

#### 1) 剪颖去雄法

整好的母本穗子在杂交前一天下午或当天开花以前进行去雄。先把上部的叶鞘剪去一部分,露出穗子,然后用剪刀斜剪去颖的  $1/4 \sim 1/3$ 。因内颖靠近雌蕊,所以要从外颖面剪,以免伤及柱头。然后把镊子伸入颖内,轻轻夹出 6 个花药,注意不要夹破花药,不要损伤柱头。将去雄后的穗子套袋挂牌,注明母本名称及去雄日期(图 2-6)。这种方法易伤花器,结实率低,一般只有 5% 左右。

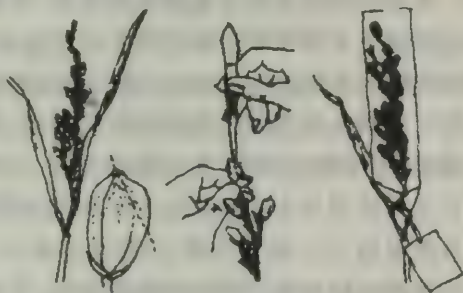


图 2-6 水稻剪颖去雄操作过程

(引自邱奉同,刘林德 1992)

#### 2) 遮光去雄法

水稻开花前光照骤然变暗,可促使颖花提前开颖,花丝伸长,但花药未成熟不开裂,因此便于去雄。在开花前 1 h 用特别的黑纸袋将选好的作母本的穗子套住,刺激当天要开的花提前开颖。大约在遮光后  $10 \sim 20$  min 后,颖片陆续张开,花丝伸长,此时花药尚未开裂,移去黑纸袋,迅速用镊子自上而下把花药摘除,并剪去穗上未开的小穗。若发现花药已开裂,则要剪掉此花,重新套袋挂牌。

这种去雄法最为方便,且不易损伤花器。但套袋的时间不容易掌握,套袋时间过短、开花不多,过长则花药已在袋内破裂,会发生自花授粉,并且由于一次所开的花较多,往往去雄工作跟不上。

#### 3) 温水杀雄法(图 2-7)

水稻的花粉和柱头对高温的敏感程度不同,雌蕊比雄蕊对高温有较好的耐受力,控制一定的



图 2-7 水稻温水杀雄

(引自邱奉同,刘林德 1992)



水温和持续时间浸泡稻穗,使能恰好杀死花粉而对柱头无影响,即可达到集体杀雄、简化去雄手续的目的。在自然开花前 1 h,选取穗部抽出叶鞘  $2/3 \sim 3/4$  以上的母本穗,将暖水瓶中的水温调整到  $43 \sim 45^{\circ}\text{C}$ ,然后将稻穗轻轻压入水瓶的水中, $43^{\circ}\text{C}$  温水浸泡  $8 \sim 10 \text{ min}$ ,或  $45^{\circ}\text{C}$  的温水浸泡  $3 \sim 5 \text{ min}$ 。然后取出,套上玻璃纸袋,由于温水有促进开花的作用,十几分钟后花即陆续开放。用剪刀将未开花的小花一律去掉,套袋挂牌,注明母本及去雄日期。

应用“温水杀雄法”应注意处理的时间不可过早或太迟。过早则去雄后采不到花粉,颖花已经闭合不好授粉,过迟则会发生自花授粉。

### (3) 采粉及授粉

摇动颖花开放的父本穗子,使花粉散出,在父本穗下放一张白纸收集父本的花粉。收集到的花粉应迅速给母本授粉,可用镊子夹点花粉轻轻放在母本的柱头上,也可用镊子夹取将要开裂的两个花药放在母本的柱头上。应注意的是,每个穗子的授粉时间不能超过  $3 \text{ min}$ 。另一种方法是:剪下即将开花的父本小穗,此时对着太阳可看到 6 个花药已顶到内颖的顶端,说明花粉已成熟花药即将开裂。拨开内外颖,用镊子取出花药,在太阳光下照一会使其干燥,让花药裂开,然后轻轻地把鲜黄色花粉放到母本的柱头上。父本的小穗可随用随取。在更换杂交品种时,手和用具都要用  $70\%$  酒精浸擦,以防花粉混杂。

将授过粉的穗子用玻璃纸袋套好,下面用大头针别住,在纸牌上说明父本名称及授粉日期,同时剪去纸牌下方一角,作为已授粉的标志。

### (4) 受精情况检查及收获

授粉几天后可以检查杂交情况,子房膨大的表示已受精,子房不膨大则说明未能受精。杂交 20 天后即可收获种子,把成熟的稻穗按组合收回保存。

## 3. 棉花人工杂交步骤及方法

### (1) 去雄

在母本典型株上,选择中部  $2 \sim 6$  个果枝上靠近主干第一、第二节位的花朵去雄。去雄时间以开花前一天下午为宜,亦可在杂交当日清晨花朵未开放时进行,这时去雄花朵的花冠应已露出苞叶,花朵即可开放。常用的去雄方法有三种。

#### 1) 手剥去雄法(图 2-8)

用刀片从花萼上缘一侧切入(深度以不伤及子房为度),然后自右向左旋转,将花冠连同雄蕊一起剥离子房。注意不要折断花柱的柱头。剥下花冠后,若有残留小片雄蕊管,可用镊子夹住雄蕊管撕下,去雄后,在柱头上套一蜡管(约  $3 \text{ cm}$  长,一端封闭),管的顶端与柱头之间保持间隔  $1 \text{ cm}$  左右。也可用麦秆管或塑料管代替蜡管。去雄时不要损伤苞叶,以免影响发育和杂交质量。

#### 2) 麦管去雄法

用剪刀剪去花冠上部,露出柱头和部分花药,再用长  $4 \text{ cm}$  一端折封、比柱头粗



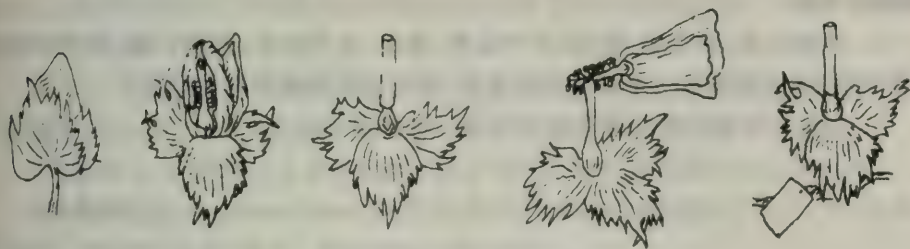


图 2-8 棉花去雄授粉

(引自邱奉同, 刘林德 1992)

的麦管从柱头上套下,并轻轻转动向下压,使花丝折断花药脱落。去雄干净后,麦管仍然套在柱头上进行隔离。

### 3) 剪雄法

用剪刀从花冠两侧剪开一条缝,拨开花冠,使雄蕊露出。也可剪去上部一部分花冠使雄蕊露出。用镊子或剪刀除去花药,如有残留花粉,可用清水冲洗。去雄后,用麦管套住柱头进行隔离。把纸牌套在去雄花朵的节上,并写明母本名称及去雄日期。这种方法比较麻烦费工,但花器受伤小,结铃率高。

### (2) 授粉

选取父本典型株,于杂交的前一天下午或当天清晨去雄的同时,选取与去雄母本同时开放的花朵,用棉线将花冠顶端扎住,以防昆虫和风力把其他花粉带入。扎结的高低、松紧都要适宜,不要扎破花冠和扎住柱头。

授粉最好在上午 9:00~11:00 进行,因这时的花粉和柱头活力较强。授粉前先用放大镜检查母本柱头上是否有去雄时残留下来的花粉粒,当天去雄的可用毛笔轻轻将花粉粒拂拭掉,前一天下午去雄的,该花则不宜再作杂交用。授粉时用镊子从父本花上撕取约 2/3 的雄蕊管,在母本的柱头上涂抹几次,待柱头粘满花粉粒之后再套上蜡管。在纸牌上写明父本名称及授粉日期。

为防止棉铃脱落,提高成铃率,对母本植株要加强整枝,去旁尖,疏去过多的花蕾。

### (3) 收获

吐絮时,先收杂交铃,将棉籽及纸牌一同装入纸袋内,按组合分别存放。

### 【注意事项】

不同作物的生育期不同,为了使杂交用的父母本花期相遇,可在播种时进行调节,即进行分期播种:将所有父母本种子分 2~3 次,隔 7~10 d 分期播种。若播种后发现花期不遇,可在幼苗期进行日照处理或加大肥水量促使作物旺长推迟开花期。

**【实验报告】**

1. 选用小麦(或水稻、棉花)两个品种,做正、反交组合,各做4穗,其中一穗不授粉,以检查去雄质量。统计杂交结实率,并分析成功或失败的原因。
2. 如何把传统的杂交育种技术与现代育种技术结合?

(邱奉同)

## 实验 23 互补测验

**【实验目的】**

通过 *E. coli* 互补实验,探索顺反子的遗传特点并进一步加深对基因的认识。

**【实验原理】**

在经典遗传学中,基因被认为是在染色体上占据特定位置的 DNA 序列,决定特定性状的表达。基因既是功能单位,又是突变单位和重组单位,基因之间通过交换而发生重组。随着遗传学研究的发展,人们从分子水平上对基因产生了进一步地认识,基因的概念随之发生了改变。基因作为一段 DNA 序列,其中的任何碱基对都可以改变从而使基因发生突变。因此,基因内部有许多能引起遗传效应的突变位点。基因间的重组是通过染色体之间对应位置的交换而实现,而染色体对应位置的交换并不仅限于在具有转录功能的区段之间发生,染色体 DNA 的任何位置均可能发生交换,即在基因之间和基因内部的 DNA 序列中均可发生交换。因此,同一基因内部的不同突变位点可以通过重组而形成正常基因,所以,不能仅凭重组(交换)来判断基因的界限,只有通过功能性互补测验才能区别基因。

所谓功能性互补测验(complementation test),就是从基因的生理功能的角度来研究基因的互补作用。这里的互补是指一个染色体上的基因所不能编码的蛋白质,可以由另一染色体上的等位基因的产物所补充。因此,这是基因产物的互补,通过基因产物的互补而完成正常的生理功能。互补作用一般只发生在不同基因间,所以,凡是功能上可以互补的则属于不同基因,即为非等位基因;凡是功能上不能互补的,则属于同一基因,即为等位基因。基因的概念也从决定性状转变为决定一种转录产物。

在 *E. coli* 中,有不发酵乳糖的一系列突变型( $lac^-$ ),如各种  $Z^-$  突变型和  $Y^-$  突变型。各种  $Z^-$  突变型和  $Y^-$  突变型之间是可以互补的,表现为能够利用乳糖。而各种  $Z^-$  突变型相互之间、各种  $Y^-$  突变型相互之间是不能互补的,不能利用乳糖。因此,可以确定  $Z$  和  $Y$  分别是两个基因(顺反子)。

$Z$  和  $Y$  是 *E. coli* 乳糖操纵子(operon)中的两个不同的结构基因(structure

gene)。各种不同的  $Z^-$  突变型的那些位点均属于同一结构基因,不同的  $Y^-$  突变型的情况也是一样的。

*E. coli* 乳糖操纵子结构基因的互补,受下列一些因素的影响,增加了基因间互补测验的复杂性。

1) 某些  $Z^-$  突变型发生极性突变,使  $Z^-$  和  $Y^-$  突变型之间不能正常互补。

2) 调节基因(regulator gene)发生突变  $i^s$ ,突变型的表型效应与  $Z^- Y^-$  双突变型相同。因此它与  $Z^-$  或  $Y^-$  突变型均不能互补。

3) 由于基因内互补的发生,使某些  $Z^-$  突变型与另一些  $Z^-$  突变型发生互补。

重组也可使两个突变型变成野生型,所以互补测验中要排除重组的发生。为此,选用的受体菌为重组缺陷型  $rec A^-$ 。另外,由于互补作用可发生在每一杂基因子细胞中,而重组只发生在少数杂基因子细胞中,所以实验中的菌液浓度要低。这样不会妨碍互补现象的出现,却能尽量避免重组的发生。

本实验观察基因间的互补和基因内无互补的现象。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

##### (1) 受体菌株

FD1007	$F^-$ lac $Z^-$	trp	thi	str A	rec A
FD1008	$F^-$ lac $Y^-$	thi	str A	rec A	

##### (2) 供体菌株

CSH40	$F'$ lac $Y^-$	proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> / $\Delta$ (lac pro)	thi
CSH14	$F'$ lac $Z^-$	proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> / $\Delta$ (lac pro)	thi supE

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

超净工作台、离心机、分光光度计、恒温振荡器、接种环、pH 试纸、无菌培养皿(9 cm)、三角瓶(150 ml)、试管(15 mm×150 mm)、无菌移液管(0.1、0.5、1.5、10 ml)、量筒(5、10、25、100、500 ml)、离心管(10 ml)、烧杯(50、100、250、500 ml)、称量瓶(5、10 ml)、滴管、玻璃涂棒、玻璃棒、酒精灯等。

##### (2) 试剂和培养基

1) LB 液(加乳糖 10 g/L) 蛋白胨 10 g、酵母浸出汁 5 g、氯化钠 10 g, pH 7.5。每组 16 管,每管 5 ml。

2) 含乳糖、色氨酸、链霉素的基本培养基 10×A 缓冲液 100 ml、VB<sub>1</sub> (1 mg/ml) 4 ml、MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(0.25 mol/L)4 ml。加蒸馏水至 1 000 ml。氨基酸(10 mg/ml) 4 ml、链霉素(50 mg/ml) 4 ml。每组 12~24 皿。

3) 乳糖 EMB 培养基 每组 16 皿。

4) 10×A 缓冲液 磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)105 g、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)



45 g、硫酸铵  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 g、柠檬酸钠  $(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$  5 g, 加蒸馏水至 1 000 ml, pH 7.0。

5) 0.85% 生理盐水 每组 36 管, 每管 4.5 ml。

6) 4 mg/ml 邻硝基  $\beta$ -D-半乳糖苷 (*O*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside,  $\beta$ -ONPG) 每组 5 ml。此溶液无色。

7) 0.5 mol/L 碳酸钠 每组 5 ml。

8) 甲苯

### 【实验步骤】

#### 1. 活化菌株

将各实验菌株(供体及受体)分别接种于 5 ml LB 液中, 在 30°C 条件下培养过夜。

#### 2. 扩菌培养

吸取经活化的供体及受体菌液 1 ml, 分别加入 5 ml 鲜的 LB 液中扩菌培养 3 h。

#### 3. 杂交培养

3 h 后, 按右表组合各取 1 ml 混合, 37°C, 轻摇 30 min。然后将各组合的混合菌液用无菌生理盐水稀释至  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ , 各吸取 0.1 ml 分别涂在 2~4 个含乳糖和链霉素的基本培养基平板上。同时将供体和受体的 4 个菌株也稀释至  $10^{-4}$ , 各吸取 0.1 ml 涂在两个同样的平板上作为对照。以上平板置 37°C 条件下培养 48 h。

供体 \ 受体	CSH40	CSH14
FD1007		
FD1008		

#### 4. 划线分离

观察实验组和对照组平板上的菌落情况, 然后将在基本培养基上长出的实验组和对照组的菌落各取 2 个在 EMB 平板上划线分离。37°C 培养过夜。

观察 EMB 平板上菌落的情况, 可观察到基因间有互补, 基因内无互补的结果。然后将在 EMB 平板上长出的互补菌落(紫红色)、不能互补的菌落(白色)以及各对照菌株的白色菌落, 分别接种于含乳糖的 LB 液中, 30°C 培养过夜。

#### 5. 定性测定半乳糖苷酶

将菌液离心, 用  $1 \times \text{A}$  缓冲液洗涤两次, 最后用 5 ml  $1 \times \text{A}$  缓冲液悬浮菌体。取 1 ml 菌液, 加 1 滴甲苯, 立即振荡 10 s, 然后在 37°C 恒温摇床上轻摇 40 min, 目的是让甲苯挥发(甲苯的作用是破坏细胞, 使酶得以释放)。

取 0.2 ml 的  $\beta$ -ONPG (4 mg/ml) 加入经甲苯处理过的菌液中, 在 37°C 恒温水浴摇床上继续轻摇 5 min、观察菌液颜色的变化。若菌液中有  $\beta$ -半乳糖苷酶, 则  $\beta$ -ONPG 可被分解, 释放出黄色的对硝基苯酚 (*O*-nitrophenol)。这就是  $\beta$ -半乳糖苷酶的定性分析。

最后,根据实验结果填入下表。互补测验的工作程序见图 2-9。

供 体 受 体	CSH40		CSH14	
	互 补	与 $\beta$ -ONPG 的颜色反应	互 补	与 $\beta$ -ONPG 的颜色反应
FD1007				
FD1008				

菌 株	CSH40	CSH14	FD1007	FD1008
与 $\beta$ -ONPG 的颜色反应				

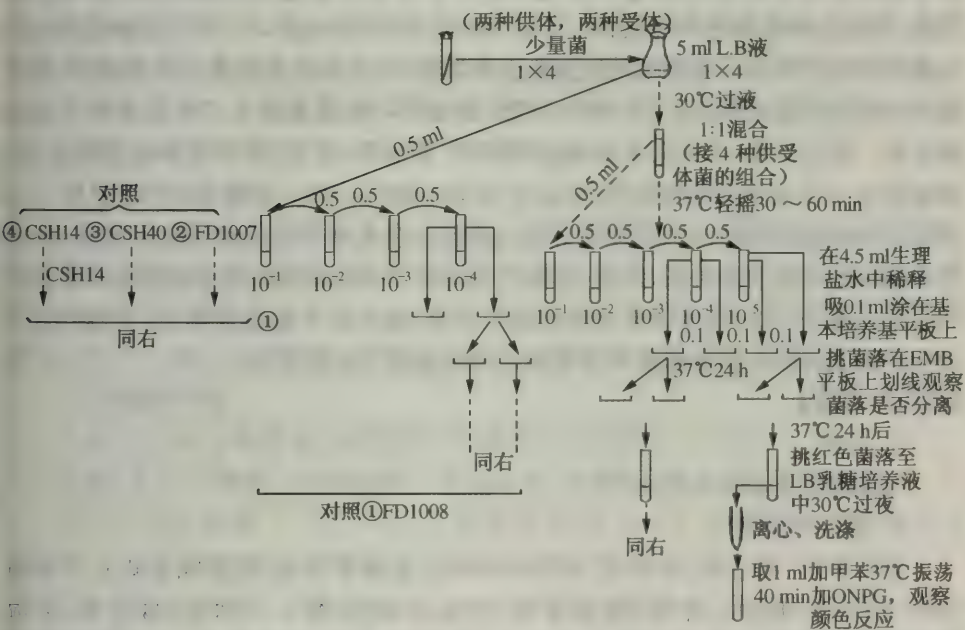


图 2-9 互补测验工作程序

(引自梁彦生等 1989)

【实验报告】

1. 能互补的菌落在 EMB 平板上划线,为何出现分离?
2. 亲本菌株在加乳糖的基本培养基上表现如何? 试解释其原因。
3. 互补测验中为什么要排除重组? 在本实验中采取了哪些措施?
4. 将试验结果做出报告,并对实验结果加以分析。
5. 根据实验结果给顺反子下一个定义。

(邱奉同)

## 实验 24 人体外周血淋巴细胞姊妹染色单体区分染色法

### 【实验目的】

1. 了解姊妹染色单体区分染色法的原理和制作 SCE 标本的基本方法。
2. 了解 SCE 计数在诱变剂检测中的作用。

### 【实验原理】

某些药物及射线等因素对染色体具有诱变效应,但微量时的效果通过一般的畸变观察分辨不出来,而染色单体之间遗传上等价的染色质部分则受其影响发生交换,即发生姊妹染色单体交换(sister chromatid exchange, SCE)。这种交换的发生就可以通过姊妹染色单体的区分染色来观察,在互换处可见有一界限明显、颜色深浅对称的互换片断,且可作 SCE 计数,即使在一定距离发生多次互换亦可被检测出来。研究发现,引起染色体伤害的因素(如病毒、X 线、紫外线和化学诱变剂)都能增加 SCE 的发生频率。目前认为 SCE 反映了 DNA 的损伤,可以使用 SCE 作为突变形成的指标。SCE 分析方法比观察染色体畸变更简便、迅速、敏感,并表现出很好的剂量效应关系,因此,目前已将此法列为检测诱变剂或致癌物的常规指标之一。此外,这一技术无疑为研究细胞周期、染色体半保留复制、染色体的分子结构和畸变、DNA 损伤修复等重要理论问题提供了新的手段。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

人或哺乳类动物外周血。

#### 2. 用具与药品

分析天平、离心机(水平式、4 000 r/min)、恒温培养箱(电热隔水式)、干燥箱(50~300℃)、超净工作台、普通冰箱、恒温水浴锅、高压灭菌锅、真空泵、铝饭盒、紫外线灯、铁丝架、染色玻璃板、离心管、吸管、刻度移液管(5 ml)、试管架、量筒、培养瓶(青霉素瓶)、试剂瓶、抽滤瓶、G-5 漏斗、2 ml 无菌注射器、针头(5<sup>#</sup>、7<sup>#</sup>)、采血针、棉签、剪刀、镊子、酒精灯、烧杯、载玻片、切片盒、精密 pH 试纸、黑纸、记录本。

RPMI1640 干粉培养基、小牛血清、PHA、肝素、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、吉姆萨(Giemsa)、青霉素、链霉素、柠檬酸钠、5%碳酸氢钠、2%碘酒、75%乙醇、氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、甘油、甲醇、冰醋酸、10 μg/ml 秋水仙素。

### 【实验步骤】

#### 1. 器皿的清洗与消毒

将针头、针管、培养瓶(用青霉素瓶)、刻度移液管、抽滤瓶、G-5 漏斗、烧杯、量



筒等玻璃器皿先经洗液浸泡,用自来水彻底冲干净,最后用蒸馏水、双蒸水各冲洗3遍,在烘箱中烘干。将针头针管、培养瓶装入铝饭盒、覆盖纱布,其他器皿也要用纱布或牛皮纸包好,连同橡皮用具等,一起在高压锅中灭菌。

## 2. 溶液配制

1) 生理盐水 0.85 g NaCl 溶于 100 ml 重蒸水中。

2) 肝素溶液 160 mg(125 单位/mg)肝素钠溶于 40 ml 的生理盐水中。

3) 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 5 g 碳酸氢钠溶于 100 ml 重蒸水中。以上三种溶液都要在 0.056 MPa 高压灭菌 15 min。

4) 秋水仙素溶液 称取 10 mg 秋水仙素,溶于 10 ml 重蒸水中,取 1 ml,稀释到 100 ml,浓度为 10 μg/ml。

5) BrdU 溶液 称 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 2 mg,在超净工作台上装入无菌青霉素瓶,加无菌生理盐水 4 ml,用黑纸包好避光,置冰箱保存。最好现配现用。

6) 双抗溶液 青霉素、链霉素,按原针剂的效价,各自用无菌生理盐水,按含 2 万单位/ml 配制,两者混合后,为 1 万单位/ml。

7) 0.4% KCl 溶液 4 g KCl,溶于 1 000 ml 蒸馏水中。

8) PHA 溶液 市售的为每瓶 10 mg,临用前用 2 ml 无菌生理盐水溶解。如要自制,可取 6 g 菜豆豆粉,放于小烧杯中,加入 25 ml 生理盐水,充分搅匀,置于 4℃ 冰箱中 24 h,然后以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,按 1:10 用生理盐水稀释,用 G-5 滤斗抽滤除菌,在超净工作台上分装成小瓶,置冰箱保存。

## 9) 磷酸缓冲液

A 液: 9.465 g 磷酸氢二钠溶解于蒸馏水中,定容到 1 000 ml。

B 液: 9.07 g 磷酸二氢钾溶解于蒸馏水中,定容到 1 000 ml。

10) 2×SSC 溶液 0.3 mol/L 氯化钠、0.03 mol/L 柠檬酸钠: 称 17.54 g 氯化钠、8.82 g 柠檬酸钠,用蒸馏水溶解后定容到 1 000 ml。

11) Giemsa 母液 称取 0.5 g Giemsa 粉置于研钵中,加入几滴甘油,充分研磨后,再加入 33 ml 甘油,在 60℃ 温箱中放置 2 h,然后用 33 ml 甲醇分几次将其冲洗到棕色瓶中。

## 3. 培养液的配制

称 RPMI1640 干粉 1.05 g,溶于 100 ml 重蒸水中,在超净工作台上用 G-5 滤斗抽滤除菌。将无菌培养液倒入灭菌的烧杯中,加入 25 ml 灭活的小牛血清、0.2 ml 肝素、1.25 ml 双抗,使双抗最终浓度为每 ml 培养液 100 单位,用 5% 碳酸氢钠调 pH 至 7.2,再用刻度移液管分装在青霉素小瓶中,每瓶 5 ml。

## 4. 加血与培养

用肝素湿润针管,用碘酒、酒精棉球擦净采血处,用 7# 针头采静脉血 2 ml,在超净工作台上按每瓶 0.2~0.3 ml 的量加入培养液中,再加入 0.2 ml PHA(因效

价、出厂日期不同,用量可有所改变)、0.1 ml BrdU,使 BrdU 的最终浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$ 。摇匀,塞上瓶塞,用黑纸包好后,在 37℃ 温箱中避光培养 72 h。

### 5. 制片

#### (1) 培养和离心

培养 66~68 h 后,在每瓶中用 5# 针头加入秋水仙素 1 滴,使最终浓度为 0.01~0.02  $\mu\text{g/ml}$ ,继续培养 4~6 h。培养结束后,将培养液及材料转入离心管,1000 r/min 离心 10 min。

#### (2) 低渗

倒掉上层培养液后,加入 6 ml 预热的 0.4% KCl(37℃)水浴中低渗 15 min,1000 r/min 离心 10 min。

#### (3) 固定

倒掉低渗液,加入固定液(甲醇 3 份、冰醋酸 1 份,临时配制),固定 15 min 后离心。连续固定、离心 3 次。

#### (4) 滴片

最后一次固定离心后,保留下层固定液约 0.5 ml,冲匀,用滴管在 10 cm 高处将材料滴在冰片上(干净载玻片装入烧杯,加上蒸馏水,在冰箱中冷冻 2 h 以上),每片滴 2 滴,立即在酒精灯上烤干。

#### (5) 照射处理

在恒温水浴中放一铝饭盒,饭盒内放一铁丝架或玻璃架,加入 2×SSC 溶液(50℃),溶液的高度以不超过铁丝架为准(最好接近)。在室温下将染色体制片放置一天以上,滴两滴 2×SSC 溶液,将片子放在铁丝架上,上盖一小张擦镜纸,使纸的两边浸在饭盒的 2×SSC 溶液中,水浴锅上放一带罩的紫外灯,灯与标本垂直,照射距离为 6 cm,照射 15~50 min。

#### (6) 染色

照射完后用蒸馏水冲去擦镜纸,用 20:1 的 Giemsa 染色液(pH 6.8)染色 10~20 min。

#### (7) 镜检

片子经自来水、蒸馏水冲洗后,自然干燥,在高倍镜下进行检查。

### 【注意事项】

在看到的中期分裂相中,可以看到两条姊妹染色单体着色显著不同,一条染色深,一条染色浅,并能看到有的姊妹染色单体进行了交换。在统计时,若交换发生在染色体端部,则算为一个交换,发生在染色体中间的则算为两个交换。

若被检查者有某种疾病,或经常接触有害物质,或采用正常人的血液,但在培养过程中加入了诱变剂,则交换频率会大大增加。

**【实验报告】**

1. 绘制在含有 BrdU 培养液中连续生长三个细胞周期的细胞及其染色体的模式图。
2. 本实验为什么要在全黑的条件下培养?

(邱奉同)

## 实验 25 小鼠骨髓细胞染色体显带技术与姊妹染色单体色差法

**【实验目的】**

掌握制作动物骨髓细胞染色体标本的方法,练习染色体显带技术与姊妹染色单体色差技术。

**【实验原理】**

常规染色体组型分析是根据染色体的外部形态和结构来进行的。在辨认相似染色体和鉴别结构变异上具有一定的困难。20 世纪 70 年代开始,研究者对染色体采用了热、碱、盐和酶等处理方法,使染色体分化,再经不同的方法显色,使染色体臂上显示出了特定的带纹(如有 C 带、Q 带、R 带和 G 带等)。染色体产生的色带(暗带)和未染色的明带相间的带型(banding patterns),形成了鲜明的染色体个体性。这样,无论对鉴别染色体和染色体组型,还是就染色体的结构与功能的研究,都开辟了一条新的途径。

染色体的 C 带是特异性地显示结构异染色质的带,可以专一地显示着丝粒区域的结构异染色质。在制作 C 带标本时,染色体要经酸、碱和 SSC 处理。酸处理使 DNA 脱嘌呤,碱处理可能通过产生一个高水平的 DNA 变性,促使激发的 DNA 溶解,SSC 处理使 DNA 骨架断裂,并使断片溶解,因而可以使非 C 带区(常染色质区)的 DNA 优先被抽取,而 C 带区(异染色质区)则对 DNA 的抽取有较大的抗性,以至经 Giemsa 染色,呈现深染。本实验仅就 C 带标本的制备方法进行练习。

**【材料与用品】**

1. 材料

小鼠(*Mus musculus*)。

2. 用具与药品

- (1) 用具

离心机、显微镜、台式天平、恒温水浴锅、解剖器、无菌注射器(2 ml, 4#、6# 针头)、离心管、吸管、烧杯、量筒、载玻片、紫外灯(30 瓦)。



## (2) 药品

1) 10%酵母制剂 干酵母 2.5 g、葡萄糖 5.5 g,加 25 ml 40℃无菌水,充分混匀后,置 40℃温箱保温 1.5~2 h,待液体表面有少量气泡出现时即可。此制剂的作用是刺激骨髓细胞的有丝分裂,以增加有丝分裂的细胞数目。

2) 5-溴脱氧尿嘧啶核苷或 5-碘脱氧尿嘧啶核苷 使用量为 0.5 mg/g 体重。

3) 阳性对照药物 环磷酰胺或丝裂霉素 C 或甲基磺酸甲酯。使用剂量分别为 10~30  $\mu\text{g/g}$  体重、0.5  $\mu\text{g/g}$  体重、5~10  $\mu\text{g/g}$  体重。

4) 秋水仙素溶液 1 mg/ml、0.85%生理盐水、1%(或 3%)Giemsa(吉姆萨)原液、1/15 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)、2×SSC 溶液、氯化钾(0.075 mol/L)、固定液(3 甲醇:1 冰醋酸)、0.2 mol/L HCl、饱和的(5%)氢氧化钡溶液、20 mg/ml 玉米油。

## 【实验步骤】

### 1. 小鼠骨髓染色体标本制作

#### (1) 秋水仙素预处理

实验前 3~3.5 h,腹腔注射秋水仙碱溶液,每 10 g 体重注入 50~80  $\mu\text{g}$  秋水仙碱。

#### (2) 分离骨髓细胞

断头法处死小鼠,立即取股骨,剥去肌肉,将股骨剪为几段,浸入 5 ml 0.85%生理盐水中,反复搅动以使骨髓腔中的骨髓细胞冲刷出来。除去碎股骨后,将细胞悬液移入离心管中以 1 000 r/min 的速度离心 10 min,弃去上清液。再用 0.85%生理盐水洗涤,加入 1/3 离心管的生理盐水,用吸管反复吸打。再次离心 10 min,弃去上清液。

#### (3) 低渗处理

加入 4 ml 预温(37℃)的 0.075 mol/L 氯化钾,用吸管吸打混匀,置 37℃温箱中处理 25 min 左右,使细胞吸胀。

#### (4) 固定

1) 预固定 在低渗处理的同时,可加入 1~2 ml(或几滴)固定液进行预固定,目的在于防止离心时细胞结团。

2) 第一次固定 低渗处理和预固定后,进行离心,要求与上述一样,吸取上清液,先加入 0.5 ml 固定液,小心用吸管吹打混匀,再加入 4.5 ml 的固定液混匀后,静置 15~30 min。

3) 第二次固定 静置后的材料再离心,吸取上清液,加入 5 ml 固定液,吹打混匀,静置 15~30 min。

4) 第三次固定 操作同上。充分的固定,有助于获得染色体清晰、分散良

好的染色体标本,所以,第三次固定的时间可延长至过夜。

5) 滴片第三次固定后 离心,吸去大部分上清液,根据沉淀物的多少留下一定量的固定液(一般留 0.5~1 ml),混匀后进行滴片。先滴一张片染色,若制片中中期分裂相较多且染色体分散较好,则可继续滴片,以作分带之用。

## 2. Giemsa 显带

1) 将小鼠骨髓染色体制片老化 3~7 d 后,放入 0.2 mol/L HCl 中处理 1 h。

2) 蒸馏水冲洗后,将制片转入 50~65℃ 5%氢氧化钡溶液中 5~15 min(也有人在 55℃条件下处理 20~25 s)。

3) 自来水冲洗后,再用温蒸馏水冲洗;直至氢氧化钡冲净为止。然后将制片置于 60~65℃条件下 1~1.5 h。

4) 蒸馏水冲洗,自然干燥。

5) 1:20 Giemsa 染液染色 5~6 min。

6) 自来水冲洗,自然干燥后即可镜检。

## 3. 姐妹染色单体色差

### (1) 实验设计

为方便观测 SCE,在制作 SCD 之前加入能激发 SCE 的药物。也可自己设计,找几种药物测定其对 SCE 产生的影响。实验用鼠一般选用 6~8 周龄,体重约为 20 g 的纯系雄性(或雌、雄各半)小鼠。将小鼠分为 5 组,每组 5 只,分别用于阳性对照组、测试组和空白对照组。

### 1) 阳性对照组

用能强烈诱发 SCE 的药物环磷酰胺或丝裂霉素 C 或甲基磺酸甲酯,采取一次性腹腔注射的办法给药。使用剂量分别为 10~30  $\mu\text{g/g}$  体重、0.5  $\mu\text{g/g}$  体重、5~10  $\mu\text{g/g}$  体重。

### 2) 测试组

分为 3 组,低剂量组的药物用量为临床剂量的 5 倍,中剂量组的药物用量为临床剂量的 20 倍,高剂量组的药物用量为临床剂量的 100 倍。待测药物结合其溶解度选择相应的方法进行溶解,给药方法以参考临床服药方法为好,或腹腔注射或灌服。给药次数根据实际情况而定。

### 3) 空白对照组

注射实验中的有关溶剂,如生理盐水、蒸馏水等。注射剂量为 0.2 ml/只。

### (2) 实验步骤

1) 腹腔注射待测药物、阳性对照药物和空白对照物。

2) 1 h 后,在小鼠背部皮下注射 10%的酵母制剂 0.3 ml/只。

3) 24 h 后,在股骨沟注射 0.5 ml 内含 10 mg BrdU 或 IdU 的玉米油。用玉米油作为媒介物,目的是使核苷类似物能较长时间地保存在体内。

4) 14 h 后,腹腔注射 1 mg/ml 的秋水仙碱 0.1 ml/只。

5) 16 h 后,断颈处死小鼠,按常规方法制备染色体标本。

6) 紫外光分化染色(FPG 法)。制片老化 1~3 d 后,载片上滴满  $2\times$ SSC 溶液后,放在  $45\sim 48^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴锅的铝板上,使锅内的水位高至铝板,这样可保证铝板的温度为  $45\sim 48^{\circ}\text{C}$ ,在灯距为 6 cm 的紫外光灯(30 W)下照射 40 min 左右,然后用蒸馏水或磷酸缓冲液(pH 6.8)洗去载片上的  $2\times$ SSC 溶液,吹干或自然干燥后,用 1%Giemse(1:20)染色 5~10 min,水洗、晾干后镜检。

7) SCE 计数。选择 30~50 个染色体长短适中,分散良好的中期相细胞,按下表进行 SCE 的统计。

组 别	供试小鼠数	出现姊妹染色单体色差的细胞数	姊妹染色单体互换(SCE)		T 值
			SCE 总数	平均值 SCE/细胞	

### 【实验报告】

1. 能否将 C 带技术和 SCE 技术合并到一起进行染色体标本制作?
2. 小鼠染色体数目是多少? 根据着丝粒的位置它们属于哪一种类型的染色体?
3. 如何区分雌、雄个体的染色体?

(邱奉同)

## 实验 26 植物原生质体的分离再生

### 【实验目的】

1. 学习植物原生质体的分离和培养技术。
2. 观察原生质体壁的再生和细胞分裂。

### 【实验原理】

原生质体是植物细胞的一部分,位于细胞壁内。因此,必须除去细胞壁,才能获得原生质体。一般通过酶的消化来分离原生质体,但这种方法仅局限于具有初生细胞壁的组织。植物细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶质和少量的蛋白质和脂类组成的。由于这些不同物质的化学键,必须使用混合酶液以降解细胞壁。通常混合使用纤维素酶和果胶酶分离原生质体。

### 【材料与用品】

1. 材料  
大白菜幼苗。
2. 用具及药品



超净工作台、台式离心机、倒置显微镜、尼龙过滤网(400 目)、Millipore 过滤器支持物、滤膜(孔径 0.45  $\mu\text{m}$ )、镊子、剪刀、离心管(10 ml)、巴斯德吸管、直径 70 mm 培养皿和 50 mm 圆形培养瓶和烧杯(100 ml 及 400 ml)。

70%乙醇、8%次氯酸钠、D-山梨糖醇、D-葡萄糖、D-木糖、水解酪蛋白、2,4-D、萘乙酸、苄基腺嘌呤、果胶酶、纤维素酶、Driselase、B<sub>5</sub> 培养基。

B<sub>5</sub> 培养基的成分(pH 5.5)如下。

大量元素(mg/L)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> · EDTA	KNO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
134	150	27.8	37.3	2 500	370.0	150

微量元素(mg/L)

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	KI
0.025	10	2	3	0.025	0.25	0.75

维生素(mg/L)

烟 酸	VB <sub>6</sub>	肌 醇	VB <sub>1</sub>
1.0	1.0	100	10.0

有机成分(g/L)

蔗 糖	20.0	琼 脂	6.0
-----	------	-----	-----

生长调节物质(mg/L)

2,4-D	0.1~1.0	激 动 素	0.1
-------	---------	-------	-----

【实验步骤】

1. 叶肉组织的原生质体的分离和培养
  - 1) 实验前将在温室条件下生长 20~30 d 的大白菜幼苗的叶片转移到黑暗中一天。选取第一和第二片真叶。
  - 2) 在超净工作台内,把叶片浸在盛有 70%乙醇的烧杯内 1 min,然后放到 8%次氯酸钠液中,浸泡 4~5 min。用无菌水冲洗 5 次,放在烧杯内备用。注意,此步及以下操作必须在无菌条件下完成。
  - 3) 用无菌滤纸吸干叶片水分,撕去叶片下表皮,把大约 300 mg 叶片转移到含 10 ml 酶溶液,直径 70 mm 的培养皿中。

酶液的配制：1%纤维素酶、1%果胶酶、0.6%纤维素崩解酶、3.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.7 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、275 mmol/L 山梨醇、275 mmol/L 甘露醇、3 mmol/L MES, pH 6.0。

4) 蜡膜带封住培养皿,用纸包好,放在  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  的培养箱中培育。

5) 洗涤游离的原生质体 ① 酶解后的叶片原生质体通过一插入离心管(10 ml)内的 400 目镍丝网,去掉残存的叶组织,在 1 500 r/min 的条件下,离心 5 min。② 用巴斯德吸管去掉上清液,将沉淀悬浮在 10 ml 培养基中。培养基包括  $\text{B}_5$  大量元素、微量元素、维生素和下表中的物质。

山梨醇	275 mmol/L	苄基腺嘌呤	0.5 mg/L
甘露醇	275 mmol/L	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.87 g/L
葡萄糖	2.5 g/L	2,4-D	0.5 mg/L
核糖	0.125 g/L	NAA	0.5 mg/L
水解酪蛋白	0.15 g/L	pH	6.0

③ 重复洗涤两次。

6) 原生质体的培养

① 用上述培养基 2 ml,使原生质体再悬浮。

② 吸取原生质体悬浮液,转移到直径 5 cm 的培养瓶中,密度  $(1 \sim 2) \times 10^4$  原生质体/ml。

③ 将培养瓶放入  $28^\circ\text{C}$  温箱中培养两周。在开始培养后第七天,更换一次新鲜培养基,以 1 ml 原生质体/瓶分装,然后隔 7 d 补加几滴新鲜培养基。2 周后,将培养瓶转放在 1 500 lx 光照条件培养室中培养。

2. 观察原生质体壁的再生和细胞分裂

为了观察细胞壁再生,可以在载玻片上加一滴原生质体悬液,再在悬液上加一滴用 0.4 mol/L 山梨醇配制的 0.1% 的荧光增白剂,然后用 336 nm 波长的紫外线照射。在荧光显微镜下,可看到纤维素层发出的绿色光。在倒置显微镜下,可观察细胞的分裂过程。

### 【实验报告】

1. 哪些是影响原生质体分离成功的因素? 为什么?
2. 哪些是影响原生质体再生的因素? 为什么?
3. 研究原生质体的意义是什么?

(郭善利 周国利)

## 实验 27 *E. coli* 的转化

### 【实验目的】

理解转化的原理和学习用质粒 pBR322 转化 *E. coli* 的方法。

### 【实验原理】

1928 年,Griffith 在肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)中发现了转化现象后,直到 1944 年转化因子的本质才被 Avery 等所鉴定。这是说明遗传物质基础是 DNA 的第一个明确的实验根据。转化是外源 DNA(包括染色体 DNA 和质粒 DNA)引入受体细胞,从而传递遗传信息的过程。目前,转化已成为基因工程中一种常用的基本实验手段。

在细菌转化过程中,受体细菌必须处于一种特殊的生理状态,即感受态状态(competent cell)下。用一定浓度的氯化钙处理,并辅之短时间的高热(42~45℃),受体菌即可呈现感受态。此时,外源 DNA 将容易进入受体菌,并进而在细胞中复制和表达。

pBR322 质粒带有氨苄青霉素和四环素抗性基因( $Ap^r$ 、 $Tc^r$ )。含有 pBR322 质粒的细菌具有对氨苄青霉素和四环素的抗性,在含有这两种抗生素的培养基上可以正常生活。本实验所用的 *E. coli* HB101 受体菌,不具有 pBR322 质粒,所以对氨苄青霉素和四环素是敏感的,在含有这两种抗生素的培养基上不能生活。

将抽提的 pBR322 质粒通过转化使其进入受体菌(*E. coli* HB101)后,结果实现了两个抗性基因的转移,从而使受体菌出现了抗氨苄青霉素和四环素的新性状。转化子在含有抗生素的培养基上,就可被筛选出来。转化的成功说明我们提取的质粒 DNA 是有生物活性的。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

*E. coli* HB101。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 实验用具

三角瓶(150 ml)、离心管(5 ml、10 ml)、离心机、微量注射器或微量移液器、培养皿(9 cm)、水浴摇床、温箱等。

##### (2) 培养基与试剂

1) 完全培养液(LB 液)(pH7.2~7.4) 称取蛋白胨(或多聚蛋白胨)10 g、牛肉膏 5 g、氯化钠 5 g,加蒸馏水 800 ml 溶解上述试剂,用 1 mol/L NaOH 调 pH 7.2~7.4,补加蒸馏水至 1 000 ml。0.056 MPa 灭菌 30 min。



- 2) 完全固体培养基 LB 液+2%琼脂,0.056 MPa 灭菌30 min。
- 3) 氨苄青霉素(Ap)液(20 mg/ml) 称取 Ap20 mg,加无菌蒸馏水 1 ml,临用时配制。
- 4) 75 mmol/L 氯化钙,0.105 MPa 灭菌 15 min,4℃冰箱保存。
- 5) 10 mmol/L 氯化钠,0.105 MPa 灭菌 15 min,4℃冰箱保存。
- 6) 无菌蒸馏水。

### 【实验步骤】

- 1) 接种受体菌 *E. coli* HB101 于 5 ml 的 LB 液中,37℃振荡培养过夜。
- 2) 取 2.5 ml 的细菌培养物扩菌至 50 ml 的 LB 液中,37℃继续振荡培养 1.5 h( $OD_{600} \approx 0.4$ )。
- 3) 冰浴中放置 5 min,取 5 ml 细菌培养物,以 4 000 r/min 离心 10 min(有条件时可在 4℃条件下,以 6 000 r/min 离心 5 min),收集菌体。
- 4) 菌体悬浮于 2.5 ml 冷的 10 mmol/L 氯化钠,4 000 r/min,离心 10 min(有条件时可在 4℃条件下,以 6 000 r/min 离心 5 min),洗涤菌体。
- 5) 为使细菌呈现感受态,菌体应再悬浮于 0.25 ml 冷的 75 mmol/L 氯化钙中,冰浴 20 min,注意要不断地摇动,以促使细胞膜形成小孔,有利于外源 DNA 进入细胞。
- 6) 取自制的质粒 DNA 10  $\mu$ l 和 0.1 ml 感受态细菌混合,冰浴 30 min,每隔 5 min 振荡一次,以防止菌体下沉于管底。
- 另各取受体菌 0.1 ml,质粒 DNA 10  $\mu$ l 作对照。
- 7) 将装有转化和对照样品的试管置于 42℃处理 2 min,进行热冲击,这一步骤将有利于质粒 DNA 进入受体菌。
- 8) 按下表补加 1.9 ml 的 LB 液,在 37℃培养 2 h。

	LB 液/ml	受体菌/ml	质粒 DNA/ $\mu$ l
转化组	1.9	0.1	10
受体菌对照	1.9	0.1	0
供体菌质粒 DNA 对照	1.9	0	10

### 9) 按下表处理涂平板

	LB 固体平板	
	加抗生素平板	不加抗生素平板
转化组	原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ (各 3 皿)	原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ (各 3 皿)
受体菌对照	原液(3 皿)	$10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ (各 3 皿)
供体菌质粒 DNA 对照	原液(3 皿)	原液(3 皿)



### 【实验报告】

1. 什么是转化？什么是转导？两者有什么区别？
2. 转化实验中，实验组和对照组平皿应有什么样的结果？如何解释这个结果？

(郭善利 周国利)

### 附(本实验的备选实验)

## *E. coli* 的转化实验

### 【实验目的】

学习氯化钙法制备 *E. coli* 感受态细胞和外源质粒 DNA 转入受体菌细胞的技术以及筛选转化体的技术。了解细胞转化的概念及其在分子生物学研究中的意义。

克隆的筛选：主要用不同抗生素基因筛选。常用的抗生素有：氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、四环素、链霉素等。

### 【材料与药品】

#### 1. 材料

菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ , pUC19 质粒。

#### 2. 用具及药品

无菌超净台、电热恒温水浴锅、分光光度计、离心机、移液器、微型离心管等。

LB 液体培养基和含抗生素的 LB 平板培养基(50~100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素)、预冷的  $\text{CaCl}_2$  溶液(0.1 mol/L)、氨苄青霉素(Amp)用无菌水配成 100 mg/ml 溶液,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 【实验步骤】

#### 1. 受体菌的培养

从 LB 平板上挑取新活化的 *E. coli* DH5 $\alpha$  单菌落,接种于 3~5 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$  下振荡培养 12 h 左右,直至对数生长后期。将该菌悬液以(1:50)~(1:100)的比例接种于 50~100 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 2~3 h 至  $\text{OD}_{600} \leq 0.5$  左右。注意,细胞数务必  $< 10^8/\text{ml}$ ,此为实验成功的关键。

#### 2. *E. coli* 感受态细胞的制备( $\text{CaCl}_2$ 法)

(1) 每组取培养液 3 个 4 ml 转入 4 ml 离心管中,在冰上冷却 20~30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 4 000 r/min 离心 10 min。从这一步开始,所有操作均在冰上进行,速度尽量快而稳。

(2) 倒净上清培养液,将管倒置 1 min 以便培养液流尽,用 2 ml 冰冷的 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液轻轻悬浮细胞,冰浴 30 min。



(3) 0~4℃, 4 000 r/min 离心 10 min。

(4) 弃去上清液, 加入 1 ml 冰冷的 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液, 小心悬浮细胞。0~4℃, 4 000 r/min 离心 10 min。

(5) 弃去上清液, 加入 200  $\mu\text{l}$  冰冷的 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液, 小心悬浮细胞, 冰上放置片刻后, 即制成了感受态细胞悬液。

(6) 制备好的感受态细胞悬液可直接用于转化实验, 也可加入占总体积 15% 左右高压灭菌过的甘油, 混匀后分装于 1.5 ml 离心管中, 置于 -70℃ 条件下, 可保存半年至一年。

### 3. 细胞转化

(1) 取 200  $\mu\text{l}$  感受态细胞悬液(如是冷冻保存液, 则需化冻后马上进行下面的操作), 加入质粒 DNA 2  $\mu\text{l}$  (50 ng) 混匀, 冰上放置 20~30 min。同时做两个对照组:

对照组 1: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液, 其他操作与上面相同。

对照组 2: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液, 但涂板时只取 5  $\mu\text{l}$  菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上。

(2) 于 42℃ 水浴中保温 1~2 min(热激), 然后迅速冰上冷却 2 min。

(3) 立即向上述管中分别加入 0.8 ml LB 液体培养基(不需在冰上操作), 该溶液称为转化反应原液, 摇匀后于 37℃ 振荡培养约 45~60 min, 使受体菌恢复正常生长状态, 并使转化体表达抗生素基因产物( $\text{Amp}^r$ )。

### 4. 平板培养(有时需要稀释)

(1) 取各样品培养液 0.1 ml, 分别接种于含抗生素 LB 平板培养基上, 涂匀(如果用玻璃棒涂抹, 酒精灯烧过后稍微凉一下再用, 不要过烫)。

(2) 菌液完全被培养基吸收后, 倒置培养皿, 于 37℃ 恒温培养箱内培养过夜(12~16 h), 待菌落生长良好而又未互相重叠时停止培养。用  $\text{CaCl}_2$  法制备的感受态细胞, 可使每微克超螺旋质粒 DNA 产生  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  个转化菌落。在实际工作中, 每微克有  $10^5$  以上的转化菌落足以满足一般的克隆实验。

### 5. 检出转化体和计算转化率

统计每个培养皿中的菌落数, 转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子, 根据此皿中的菌落数可计算出转化子总数和转化频率:

$$\text{转化子总数} = \frac{\text{菌落数} \times \text{稀释倍数} \times \text{转化反应原液总体积}}{\text{涂板菌液体积}}$$

$$\begin{aligned} \text{转化频率(转化子数/每 mg 质粒 DNA)} \\ = \text{转化子总数/质粒 DNA 加入量(mg)} \end{aligned}$$

$$\text{感受态细胞总数} = \frac{\text{对照组 2 菌落数} \times \text{稀释倍数} \times \text{菌液总体积}}{\text{涂板菌液体积}}$$

感受态细胞转化效率 = 转化子总数 / 感受态细胞总数

### 【注意事项】

本实验方法也适用于其他 *E. coli* 受体菌株的不同的质粒 DNA 的转化。但它们的转化效率并不一定一样。有的转化效率高,须将转化液进行多梯度稀释涂板才能得到单菌落平板,而有的转化效率低,涂板时必须将菌液浓缩(如离心),才能较准确的计算转化率。

### 【实验报告】

1. 观察各组实验的结果有什么不同并加以分析。
2. 统计菌落数,计算转化率。
3. 制备感受态细胞的原理是什么?
4. 如果实验中对照组本不该长出菌落的平板上长出了一些菌落,将如何解释这种现象?

(刘文)

## 实验 28 数量性状的遗传参数—— 遗传力的估算

### 【实验目的】

1. 以果蝇为材料,在较简便的操作条件下,用较短的时间获得亲代与其子代的一个数量性状——体长(或腹板刚毛数)的资料。
2. 运用子代对亲代的回归法这一基本的方法估计遗传力,从而了解遗传力的估算方法及其在研究生物群体数量性状遗传中的重要意义。

### 【实验原理】

群体某一数量性状的遗传方差与总的表型方差的比率,通常称为该性状的遗传力(heritability)记为  $H^2$ 。其定义式为:

$$H^2 = \frac{V_G}{V_P} \quad \text{或} \quad H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

遗传力是进行动、植物育种时必须利用的一种参考数值或统计常数之一,故称为遗传参数。遗传力可分为广义遗传力和狭义遗传力两种。

$H^2$  表示某数量性状的表型值中有  $V_G/V_P$  是由多基因累加效应造成的,则这个比率称为该数量性状的狭义遗传力,记为  $h^2$ 。其定义公式为:

$$h^2 = \frac{V_A}{V_P} \quad \text{或} \quad h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

它所表示的是,在性状由父母到子女的传递过程中可遗传并能予以固定的部分。因而它是群体最重要的性质之一。

测定遗传力的方法很多,不同生物、不同性状所适宜的方法不同,但基本的方法只有亲子相关(或回归)和同胞相关两大类。

子代与亲代的相似性表现为遗传,相似性的程度在统计遗传学中往往用相关系数或回归系数来表示。亲代与子代的相关包括子女与其母亲的相关和子女对其父、母平均值的回归,在同样条件下,后者的精确度比前者高。果蝇等实验动物在一雄配一雌的情况下,多采用子女对其父母平均值(简称中亲值)的回归法来估计遗传力。但这必须根据性状的特点来选用不同的方法。

由亲代与子代的相关关系来估计遗传力的方法是最基本又简便的方法。若亲代与子代的表型方差相同,而且雌雄性别间的方差也相同,则亲代与子代在同一性状上的相关系数即等于子代对于亲代的回归系数。此时估计遗传力用回归系数比用相关系数更为方便。

在随机交配和环境条件稳定的情况下,女儿群体某性状的标准差与母亲群体同一性状的标准差基本相同。因此,为了计算方便起见,可用女儿对于母亲的回归系数代替女儿与母亲的相关系数。

设:母亲某性状的表型值为  $P$ , 女儿该性状的表型值为  $O$ 。两者的标准差相等,即  $\sigma_P = \sigma_O$  则女、母相关系数:

$$r_{PO} = \frac{Cov_{PO}}{\sigma_P \sigma_O} = \frac{Cov_{PO}}{\sigma_P^2} = b_{OP}$$

式中,  $b_{OP}$  为女儿对于母亲的回归系数,  $Cov_{PO}$  为母本协方差。

由于:  $Cov_{G_{PO}} = \frac{1}{2}V_A$  (或  $\sigma_A$ ) (亲子基因型协方差)

$$\therefore b_{OP} = \frac{Cov_{OP}}{V_P} = \frac{Cov_{G_{OP}}}{\sigma_P^2} = \frac{\frac{1}{2}\sigma_A}{\sigma_P^2} = \frac{\frac{1}{2}V_A}{V_P}$$

$$\therefore h^2 = 2b_{OP}$$

$$\therefore V_O = V_P$$

$$\therefore r_{OP} = \frac{Cov_{OP}}{\sqrt{V_O V_P}} = \frac{Cov_{OP}}{V_P} = \frac{\frac{1}{2}V_A}{V_P}$$

$$\therefore h^2 = 2r_{OP}$$

如果性状(如增长率、体长、体宽、刚毛数等),在两性间都能表现,则可以由中亲值(即父、母同一性状的平均值)来估计遗传力:

设:子代某性状的平均值为  $O$ , 父母该性状的平均值为  $\bar{P}$



$$\text{已知: } Cov_{OP} = \frac{1}{2}V_A V_{(\frac{1}{2}P_1 + \frac{1}{2}P_2)} = \frac{1}{2}V_P$$

$$\therefore b_{OP} = \frac{Cov_{OP}}{V_{(\frac{1}{2}P_1 + \frac{1}{2}P_2)}} = \frac{\frac{1}{2}V_A}{\frac{1}{2}V_P} = \frac{V_A}{V_P} = h^2$$

$$\therefore h^2 = b_{OP}$$

现以某果蝇群体的体长的资料为例,说明用亲子关系估计遗传力的方法。资料按雄蝇(父本)分组并整理成母女配对的资料见表 2-2。

表 2-2 果蝇体长母女配对资料

单位: mm

父本 1		父本 2		父本 3		父本 4		父本 5	
母本	子女	母本	子女	母本	子女	母本	子女	母本	子女
2.77	2.72	2.45	2.82	2.41	2.82	3.09	2.72	2.68	2.77
3.00	2.54	3.09	2.77	3.14	2.82	2.41	2.82	2.86	2.95
2.90	2.63	3.27	3.00	2.82	3.63	3.05	2.72	2.32	2.59
2.41	2.77	2.59	2.63	2.82	2.95	2.45	2.72	2.63	2.63
2.77	2.59	2.41	2.82	2.54	2.50	2.82	2.82	2.77	2.90

以第一个父本内母女对的数据为例,说明计算的具体步骤。

设: 母本体长的表型值为  $X$ , 子女体长的表型平均值为  $Y$ , 列表计算如下。

	$X$	$Y$	$X^2$	$Y^2$	$XY$
	2.77	2.72	7.672 9	7.398 4	7.534 4
	3.00	2.54	9.000 0	6.451 6	7.620 0
	2.90	2.63	8.410 0	6.916 9	6.627 0
	2.41	2.77	5.808 1	7.672 9	6.676 7
	2.77	2.59	7.672 9	6.708 1	7.174 3
$\Sigma$	13.85	13.25	38.563 9	35.147 9	36.631 4

$$\Sigma X = 13.85, \Sigma Y = 13.25, \Sigma X^2 = 38.563 9,$$

$$\Sigma Y^2 = 35.147 9, \Sigma XY = 36.631 4,$$

$$C_X = \frac{(\Sigma X)^2}{n} = \frac{(13.85)^2}{5} = 38.364 5,$$

$$C_Y = \frac{(\Sigma Y)^2}{n} = \frac{(13.25)^2}{5} = 35.112 5,$$

$$C_{XY} = \frac{\Sigma X \Sigma Y}{n} = \frac{(13.85)(13.25)}{5} = 36.702 5.$$

其他各父本组也都如法一计算出上述数据,列出以下总数据表(表 2-3)。

表 2-3 父本内母女间体长表型值相关计算表

父本 组别	与配母 本 数	ΣX	ΣY	ΣX <sup>2</sup>	ΣY <sup>2</sup>	ΣXY	C <sub>X</sub>	C <sub>Y</sub>	C <sub>XY</sub>
1	5	13.85	13.25	38.563 9	35.147 9	36.631 4	38.364 5	35.112 5	36.702 5
2	5	13.81	14.04	38.759 7	39.494 6	38.886 2	38.143 2	39.424 3	38.778 4
3	5	13.73	13.72	38.024 1	37.774 2	37.736 6	37.702 5	37.647 6	37.675 1
4	5	13.82	13.80	38.613 8	38.100 0	38.113 4	38.198 4	38.088 0	38.143 2
5	5	13.26	13.84	35.334 2	38.410 4	36.819 3	35.165 5	38.309 1	36.703 6
Σ	25	68.47	68.65	189.295 5	188.927 1	188.186 9	187.574 1	188.581 5	188.002 8

计算父本内平方和乘积和:

X 的父本内平方和  $SS_{W(X)} = \sum \sum X^2 - \sum C_X$

$$= 189.295\ 5 - 187.574\ 1$$
$$= 1.721\ 4$$

Y 的父本内平方和  $SS_{W(Y)} = \sum \sum Y^2 - \sum C_Y$

$$= 188.927\ 1 - 188.581\ 5$$
$$= 0.345\ 6$$

XY 的父本内乘积和  $SS_{W(XY)} = \sum \sum XY - \sum C_{XY}$

$$= 188.186\ 9 - 188.002\ 8$$
$$= 0.184\ 1$$

按下列公式计算父本内(组内)女、母相关系数和遗传力:

父本内女母相关系数为  $r_{W(XY)} = \frac{SP_{W(XY)}}{\sqrt{SS_{W(XY)}SS_{W(X)}}}$

$$= \frac{0.184\ 1}{\sqrt{0.345\ 6 \times 1.721\ 4}}$$
$$= 0.238\ 7$$

$h^2 = 2 \times r_{W(XY)} = 2 \times 0.238\ 7 = 0.477\ 4$

这个结果告诉我们,果蝇的体长的表型变异中有 47%左右决定于遗传因素,53%左右决定于环境因素。

上述方法是为了消除雄亲(父本)群间的差异,而采用的父本内相关性。

此外,也可采用在各雄性亲本内(父本内)求子女对于母本(雌亲)的回归系数,然后进行加权平均(以母、女配对数加权),以求得平均的回归系数。这就是子女对于母亲的父本内回归,此法在畜牧业中常用。

现仍以上述资料为例,简要说明其计算方法。

按表 2-2 数据形式算出每个雄亲内的子女均值对于母本的回归系数,如果各母本的子女数相等,则可直接代入回归系数的公式:

$$b_{YX} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

利用 EL-5002 型计算器(国产或日本 SHARP 出产)可以直接求得。

如果各母本的子女数不相等,则须用下列公式计算:

$$b_{YX} = \frac{n \sum kXY - \sum kX \sum kY}{n \sum kX^2 - (\sum kX)^2}$$

式中, $k$ =各母本的子女数。

现将所计算的各父本内女儿对于母亲的回归系数列表如下。

父本组别	1	2	3	4	5
回归系数( $b_{YX}$ )	-0.350	0.1747	0.1900	0.0700	0.6800

求加权的平均回归系数,由于各雄亲的与配雌亲的数目均相等( $n_1 = n_2 = n_3 = n_4 = n_5 = n = 5$ ),即:

$$\begin{aligned} \bar{b} &= \frac{b_1(n_1) + b_2(n_2) + b_3(n_3) + b_4(n_4) + b_5(n_5)}{\sum n} \\ &= \frac{5[b_1 + b_2 + b_3 + b_4 + b_5]}{25} \\ &= 0.15294 \end{aligned}$$

$$h^2 = 2 \times 0.15294 = 0.30558$$

由于采用的方法不同,果蝇同一性状的遗传力的数值有些差异,这是各种具体方法的精确度不同造成的。

如果我们的资料是来自一雄配一雌体的设计,则可求子女均值对双亲均值(中亲值)的回归系数,此时, $h^2 = 10\bar{p}$ 。这只需要将资料整理为中亲值与子女均值的



配对数据计算出通常的回归系数,则为所求的遗传力。一般来说,该方法的精确度比前法要高,因为此方法的标准误差比前述方法的标准误差要小得多。

【材料与用品】

1. 材料

*D. melanogaster* 野生型果蝇,为了测量体长方便起见亦可考虑采用突变种残翅(vg)和匙状翅(nub<sup>2</sup>)果蝇。

2. 用具及药品

显微镜(带推进器)、测微尺(台尺、目尺配套)、EL-5002 型计算器、吸虫器、解剖镜、放大镜、毛笔、麻醉瓶、吸水纸、白瓷板和指管(或大试管)等。果蝇用培养基、乙醚等。

【实验步骤】

1) 取野外采集来的雄果蝇 5 只,麻醉,在低倍镜下用测微尺测其体长。即将麻醉好的果蝇头部朝向同一方向整齐地纵向排列在一张载玻片上,在物镜镜头筒内放入测微尺目尺。在低倍镜下观察,使果蝇侧卧,推动推进器,逐个地读出其头部触角前缘至腹部末端的小格数。然后按台尺的比例换算成毫米单位,将个体记录记入预先设计的表格内(按表 2-2 的格式)

2) 随机地取 25 只处女蝇,按 5 只雌蝇×1 只雄蝇随机地分为 5 个杂交组合,使之在中等饲养瓶中进行杂交,正常情况下培养。也可用 1 只雌蝇×1 只雄蝇的设计,但配偶数目不得少于 30 对。

3) 自杂交起 24 h 后,将各杂交组合中的受了孕的雌蝇,用吸虫器小心地逐个移入小饲养瓶中,置温箱培养,使其产生 F<sub>1</sub>。约 5~7 d 后将它们逐组、逐个地麻醉,按上述方法测其体长(也可考虑测其腹部刚毛数,以便与下一实验相互对应)的表型值,然后弃去。

4) 在每一雌亲的后代中,用吸虫器随机地取出 10 只雌蝇、10 只雄蝇,并逐个地依上法测量其体长,求其平均值,全部记录填入下表中。

实验原始记录表格形式

子女 雄杂	雌亲	母本编号及表型值		子女表型值
♂ 1	♀ 1	♀ 1		
		♀ 2		
		♀ 3		
		...		
♂ 2	♀ 1	♀ 1		
		...		

5) 子女对于母亲的加权平均回归系数及遗传力。

6) 讨论并分析其结果。

7) 本实验历时约 10~15 d, 可与其他实验穿插安排。

### 【实验报告】

1. 估计遗传力在育种实践中有什么指导意义?
2. 表现型方差与基因方差的关系怎样?
3. 思考一下, 质量性状与数量性状的研究方法有什么区别?

(郭善利 周国利)

## 实验 29 果蝇某数量性状对于选择的反应

### 【实验目的】

1. 掌握某数量性状对于选择的反应的实验方法。
2. 学习一些遗传参数的计算方法。

### 【实验原理】

遗传育种学家对改变动、植物群体的遗传组成的首要方式是对作为亲本用的个体挑选——选择。其次是对亲本的交配方式的控制, 包括近交与杂交。在考虑选择时, 暂时不计近交的效应, 因为我们假定群体相当大而足以把近交效应忽略。

选择的基本效应是改变群体中的某些基因频率。作用于某数量性状的个别座位上的基因的选择效应是无法加以定量描述的。因此, 只能利用可以观察到的平均数和方差来测定选择的效应。

如果在某群体中, 就  $x$  性状而言, 挑选出一定比例的处于该性状的表型值的正态分布最上端(上向选择)或最下端(下向选择)的个体, 由这些入选的极端类型的个体繁殖产生下一代, 下一代的群体平均值一般向选择的方向移动, 移动的程度与该性状的遗传力有关。由数量遗传学可知:

$$\Delta G = h^2 S \quad \text{或} \quad R_x = h^2 S \quad (1)$$

式中,  $\Delta G$  为遗传获得量,  $R_x$  为  $x$  性状对于选择的反应量,  $h^2$  为  $x$  性状的遗传力既在选择差中可遗传给下一代的百分数,  $S$  为亲代群体平均值与中选亲本的平均值之差, 即选择差。

$$S = \bar{x}_0 - \bar{x}_s$$

式中,  $\bar{x}_0$  = 亲代群体  $x$  性状的平均值,  $\bar{x}_s$  = 中选亲本该性状的平均值。

关系式(1)的主要用途在于预测选择的反应。只要在选择前, 从基本群体中估计了某数量性状的遗传力(如前一实验估计了果蝇体长的遗传力  $h^2 = 0.48$ , 腹部

刚毛数  $h^2 = 0.52$  等),而选择差亦是可求的,然后就可以预测中选亲本将要繁殖的子一代群体在  $x$  性状(体长或腹部刚毛数等)上的遗传获得量,也就是该性状在未来的下一代群体中将会产生多大的反应。

关系式(1)的另一形式为:

$$\therefore i = \frac{S}{\sigma_P} \qquad \therefore h^2 = \frac{\Delta G}{i\sigma_P} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}{i\sigma_P}$$

(2)

$R_x = \Delta G = \bar{x}_1 - \bar{x}_0$  是中选个体所繁殖的  $F_1$  代群体在  $x$  性状上的平均值( $\bar{x}_1$ )与亲代原群体的该性状平均值( $\bar{x}_0$ )之差,这就是遗传获得的实际值。

利用关系式(2),可以作为一种从已经实现的选择效果来估计遗传力的近似方法。Falconer 称为现实遗传力。利用观察到的一代遗传进展  $\Delta G$  可以求  $h^2$ 。这个遗传力的数值表示每个单位的选择差所获得的一代遗传进展。

本实验是以果蝇的第五腹板上的刚毛数(或体长)为选择的性状。预测选择作用的一代遗传进展,观察选择的作用在各个世代中引起的刚毛数的变化。用实验证明该性状是一种数量性状。现以 Clayton, Morris 和 Robertson(1957)在果蝇中对其腹部刚毛数的选择实验与选择反应的分析为例,说明选择反应在期望值与实测值之间相吻合的程度。

选择前,从果蝇的基本群体中估计了刚毛数的遗传力。然后,从这个群体中,取 5 个各含 100 个雄体和 100 个雌体的随机样本,测量其腹部刚毛数,求其平均值作为  $\bar{x}_0$ 。在每个样本中挑选具有最多刚毛数(上向选择)和最少刚毛数(下向选择)的个体。每种性别各选出 20 个极端类型的个体,分别求其刚毛数的平均值  $\bar{x}_S$ 。中选个体距离它们所选择的样本的平均值的离差值即选择差  $S$ 。期望的选择反应则是按(1)式求出,这是由选择差和遗传力( $h^2 = 0.52$ )的乘积得来。观测的反应则是在子代平均数与亲本所选择的样本平均数之间的差数(所有负号都省掉了)。

表 2-4 黑腹果蝇腹部刚毛数进行一代选择的结果

世 系	上 向 选 择			下 向 选 择		
	S	反 应		S	反 应	
		期 望	观 测		期 望	观 测
1	5.29	2.75	2.60	4.63	2.41	2.44
2	5.12	2.66	2.23	4.58	2.38	2.29
3	4.44	2.31	2.43	4.38	2.27	0.67
4	4.32	2.25	3.12	5.60	2.91	1.13
5	4.8	2.54	2.68	4.12	2.14	2.63
平均	4.81	2.50	2.61	4.66	2.42	1.84

从表 2-4 可见,除了第三、第四世系外,期望的选择反应值与观测的选择反应值相比较时都吻合得很好。不吻合的情况说明了只进行一个世代的选择实验所得



到的数据与预测数据之间容易产生误差。

我们以 Lawrence MJ 和 Jinks JL 以果蝇胸侧板刚毛数选择的实验程序说明具体的实验方法。

取果蝇任何一个分离群体(最好为  $F_2$  的家系)为实验的原始材料。供给实验者两个培养瓶,培养瓶 I 是  $(O \times C) \times (O \times C)$ ; 培养瓶 II 是  $(C \times O) \times (C \times O)$ 。每人在每只瓶中随机地测量 10 只雄蝇和 10 只雌蝇的胸侧板刚毛数。为了建立高刚毛数的选择系(上向选择)按图 2-11 方式进行杂交。

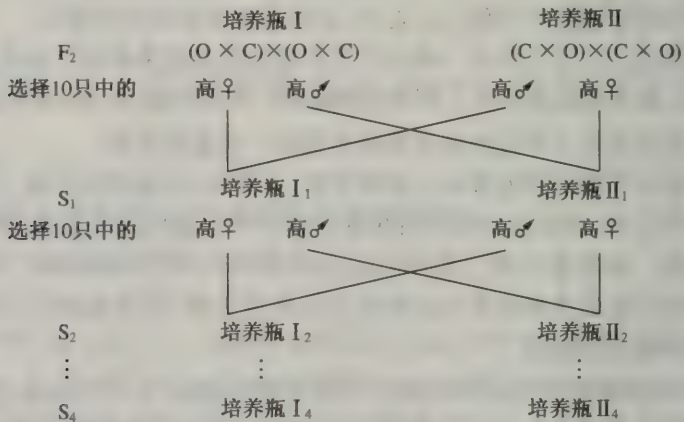


图 2-11 维持选择系的双重第一代表兄妹交配系统

(引自北京大学生物系遗传学教研室 1983)

这种交配系统比同一培养瓶中高刚毛雄蝇和高刚毛雌蝇的姊妹交配的近亲繁殖要少。低选择系(下向选择)也以同样方式建立,被选择的个体则是刚毛数最少的个体。连续选择四代之后,刚毛数在高系与低系中的变化结果如图 2-12 所示。

在这个实验模型中,留种率为 10%(从 10 个个体中选择 1 个个体作为交配用亲本,雌、雄性别中都是如此)。如果第一个选择的配偶死亡,则在每一个选择系的平行成对的培养瓶中取第二个极端的个体作为补充。

选择的实验结果表明:上向选择(高系)和下向选择(低系)对于选择都有稳定的反应。这种反应说明果蝇的刚毛数是一种数量性状。因为如果被选择的亲本的刚毛数与其培养瓶中的个体的平均刚毛数之间的差异纯属环境影响,那么将不可能期望对选择会有反应。其次,这种稳定的反应还表明,决定果蝇刚毛数目的基因有若干对,无疑这是一种数量性状。

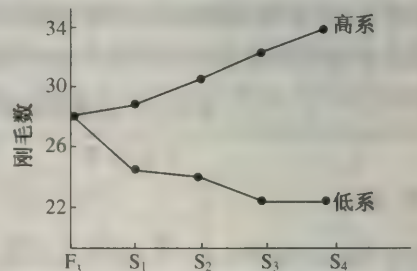


图 2-12 高低刚毛数对选择的反应

(引自北京大学生物系遗传学教研室 1983)

●: 12 个培养瓶的平均数(即 240 只果蝇)

## 【材料与用品】

## 1. 材料

*D. melanogaster* 的突变种即残翅(vg)及匙状翅(nub<sup>2</sup>)的正反交 F<sub>2</sub> 群体。

## 2. 用具及药品

电子计算器、小指型管、果蝇实验常规用具。

果蝇饲养的常规成分、乙醚或三乙基胺(麻醉时间比乙醚长,便于数刚毛数目的操作)、低浓度的酒精。

## 【实验步骤】

1. 大约在 25 天前完成下列杂交,以便取得 F<sub>2</sub> 的分离群体:

$$(vgvg \times nub^2 nub^2) \times (vgvg \times nub^2 nub^2)$$

$$(nub^2 nub^2 \times vgvg) \times (nub^2 nub^2 \times vgvg)$$

上述群体作为选择用的基础群体。

2. 从两个基础群体中随机地取出各含 10 个雄体和 10 个雌体的样本。逐批麻醉,在解剖镜下逐个地计数第五腹板刚毛数。因为果蝇的性别不同,第五腹板的位置不同(图 2-13),须加注意。

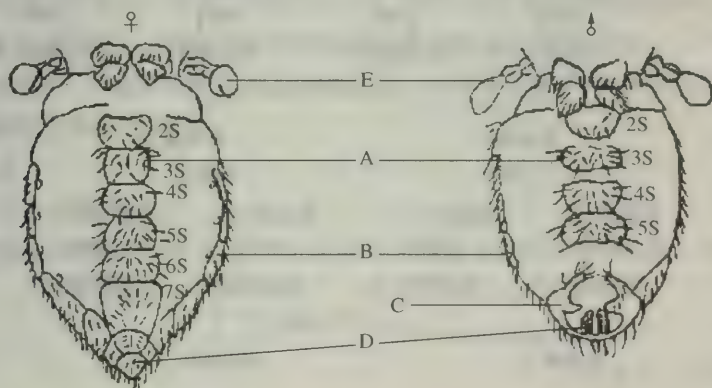


图 2-13 果蝇(雌、雄)成虫腹部结构示意图

(引自北京大学生物系遗传学教研室 1983)

A. 腹片; B. 背片; C. 生殖弓; D. 肛上板; E. 平横棒

3. 将已计数的个体分别装入小指形管中,并在指管上记录其刚毛数与性别。

4. 在每个样本中选留具有最多刚毛数和最少刚毛数的个体各 1 只,作为中选亲本(选择率或留种率为 10%)。另一部分实验者则可各选 2 只作为亲本(留种率为 20%)。留种率的不同,选择的反应也会有变化。由于我们的基本假定之一是,数量性状是正态分布的,因而留种率的大小就决定选择差的大小。另一方面选择差又决定于性状标准差的大小。因而有  $i = \frac{S}{\sigma_P}$ 。

式中,  $i$  为选择强度, 即是以性状的标准差为单位的选差,  $\sigma_P$  为性状的标准差,  $S$  为选差。

根据正态分布的理论, 留种率、选择强度的关系见表 2-5。

表 2-5 留种率、选择差和选择强度的关系( $S$  列中  $\sigma_P$  前面的数字是  $i$ )

留种率	选择差 $S = i\sigma_P$	留种率	选择差	留种率	选择差
0.01	$2.665\sigma_P$	0.30	$1.159\sigma_P$	0.64	$0.584\sigma_P$
0.05	$2.063\sigma_P$	0.36	$1.039\sigma_P$	0.70	$0.497\sigma_P$
0.10	$1.755\sigma_P$	0.40	$0.966\sigma_P$	0.76	$0.409\sigma_P$
0.15	$1.554\sigma_P$	0.50	$0.798\sigma_P$	0.80	$0.350\sigma_P$
0.20	$1.400\sigma_P$	0.56	$0.704\sigma_P$	0.90	$0.195\sigma_P$
0.25	$1.271\sigma_P$	0.60	$0.644\sigma_P$	1.00	$0.000\sigma_P$

### 5. 按图 2-14 程序进行观测及选择杂交。

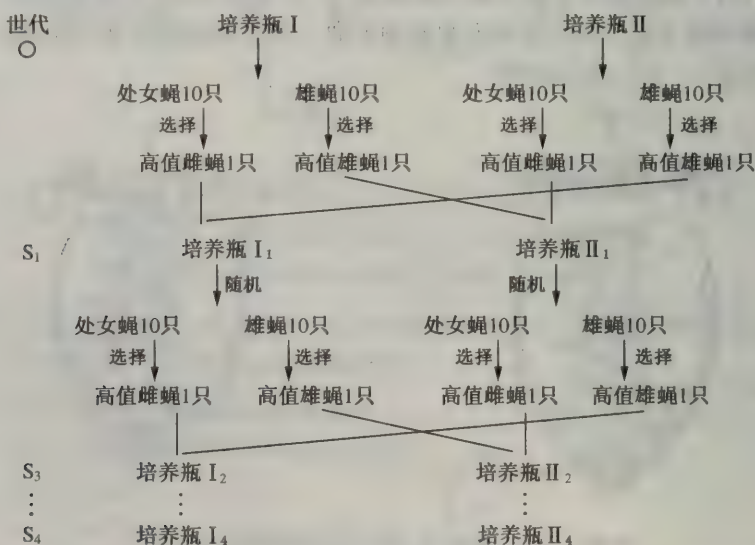


图 2-14 选择杂交程序图解

(引自北京大学生物系遗传学教研室 1983)

由另一部分实验者以同样方式建立低选择系, 当然被选择的乃是刚毛数最少的个体。

### 6. 数据整理及结果分析

① 计算基础群中(0 代)随机取得的 40 只果蝇的刚毛数的平均值与标准差( $\bar{x}_0$  及  $\sigma_0$ )。第一次中选的 4 个个体的刚毛数的平均值及标准差( $\bar{x}_S$  及  $\sigma_S$ )。以及  $S_1$  代群体中的 40 只果蝇刚毛数的平均值及标准差( $\bar{x}_{S_1}$  及  $\sigma_{S_1}$ )。

② 假定已知果蝇的腹板刚毛数的遗传力为 0.52(亦可根据前一实验中所估计



五腹节刚毛数的遗传力)按下列分别求出:

$$S = \bar{x}_0 - \bar{x}_s,$$

$$\text{期望的一代选择的反应} = R_x = h^2 S,$$

$$\text{观测的一代选择后的反应} = \bar{x}_{s_1} - \bar{x}_0.$$

将全部计算结果填入下面表格中,进行选择反应期望值与观测值的吻合性的比较。

留种率	上 向 选 择			下 向 选 择		
	S	反 应		S	反 应	
10%		期 望	观 测		期 望	观 测
20%						

③ 测量  $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_4$  各代中随机样本的刚毛数目的平均值。按高系与低系整理数据,亦作图表示刚毛数变异的情况。

7. 实验期间(自  $0 \sim S_4$  代)历时约 58 d。所用的常规培养瓶及饲料、温度等环境条件力求保持稳定。并要严防霉菌污染和成虫的非生理性死亡。

8. 果蝇第一个选择的配偶死亡,则在每一个选择系的平行成对的培养瓶中取第二个极端的个体作为补充。

### 【实验报告】

1. 写出实验结果。
2. 果蝇还有哪些数量性状? 选择其中的某一数量性状,写出一个你的实验设计。

(郭善利 周国利)

## 实验 30 异色瓢虫群体鞘翅斑纹表型与基因型频率的计算

### 【实验目的】

1. 了解异色瓢虫的生活习性、生活史、雌雄区别及其他性状特征。
2. 学会利用异色瓢虫群体的某些性状计算表型和基因型频率的方法,加深对群体遗传学基本原理和意义的理解。

### 【实验原理】

异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)俗称花大姐,是人类生活环境中最常见的一

种瓢虫,广泛分布于亚洲,是蚜虫的天敌。异色瓢虫易于捕捉,人工饲养简单易行,而且其本身也不会造成对作物的危害。因此,异色瓢虫可以作为一种方便的生物学实验材料。在普通遗传学实验中,一般多采用果蝇进行性状的遗传与变异观察。然而,除了需要常年维持果蝇突变品系之外,还要求配制和定期更换无菌培养基。如用瓢虫做实验可省去很多这类麻烦。异色瓢虫世代周期短,野外采集和人工饲养方便。我们可以用雄蜂幼虫粉末、猪肝提取液以及蚜虫等作为饲料,在培养皿中简单地饲养异色瓢虫。只要室温适当( $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ ),异色瓢虫一年四季都可产卵、繁殖。通过观察瓢虫鞘翅斑纹的嵌镶显性现象,既能具体而形象地了解基因与表型的关系、等位基因的遗传规律,也可以在成虫羽化的过程中观察到基因表达所具有时间和空间上的特异性。另外,在野外生态环境中,异色瓢虫有群集越冬的习性。这样,通过简单的采集活动有可能获得1个或多个异色瓢虫群体的信息。利用这些数据,可以对异色瓢虫群体的遗传构成进行分析。

### 1. 异色瓢虫的生活习性

异色瓢虫分布在南起台湾、北至西伯利亚的广泛地域。4~7月和9~11月最容易在野外见到成虫。4月中旬,异色瓢虫主要生活在枫树、蔷薇、果松等蚜虫发生较早的庭院植物上,5~6月则广泛分布于小麦、垂柳等植物上。此间,它们在这些植物上产下大量的卵。随着蚜虫的增加,幼虫迅速发育,成虫数量激增。这一季节里,成虫对于蚜虫的发生反应敏感、移迁性大,可以在短时间内迅速向蚜虫的多发地聚集。7月下旬~9月初,异色瓢虫在白昼高温时主要静止在草根等处,偶尔,也有进入屋内的情况。因此,几乎看不到成群的成虫和幼虫,采集相当困难。进入9月以后,天气凉爽起来,异色瓢虫开始进入第二次繁殖高峰。它们在栗树等木本植物上产卵,成虫的数目随之显著增多。从10月上旬到11月,大量异色瓢虫的成虫聚集在向阳的白色或浅色墙壁上,这是采集最方便的时期。此后,异色瓢虫开始在树皮间隙、房檐屋下、地缝等处群集越冬。成虫群集时间及地点和以气温为中心的气象要素有紧密的联系。入春后(3月份左右),越冬群体开始解散。

### 2. 异色瓢虫的生活史

异色瓢虫的卵呈淡黄色,成虫通常一次产卵15~40粒。卵经过数日孵化,发育为体长1.2~1.9 mm的黑色1龄瓢虫。刚孵化的幼虫即开始摄食,如果附近没有可供捕食的蚜虫,则蚕食未孵化的瓢虫卵,甚至同胞幼虫。3龄幼虫体长达4.2~6.9 mm。在4龄期(终龄),幼虫摄食量剧增。据福岛(1970)实验,1只4龄虫共可捕食约160只蚜虫。接近蛹期,瓢虫身体变圆,并开始分泌黏性强的液体固定尾端,进入静止状态(前蛹)。一两天后,背板裂开蜕皮,形成白色柔软的蛹,2~3 h后颜色变褐,4~6 d后蛹开始羽化。成虫鞘翅最初呈乳白色,约30 min后开始着色,呈现出黑色和红色的斑纹。

### 3. 异色瓢虫的雌雄区别

和大多数昆虫一样,异色瓢虫的雌虫比雄虫个体大,但是仅从这一点上区分是很不可靠的。最简单的区分方法是依据中胸腹板及后胸腹板、中足腿节的色差。雌瓢虫身体的这些部分都是黑褐色,而雄瓢虫色淡。另外,相对于雌瓢虫上唇为黑色,雄瓢虫的上唇为淡色。黄底型雌雄区别困难,特别有必要从这两点上加以确认。

#### 4. 瓢虫鞘翅斑纹及其遗传变异

异色瓢虫鞘翅色斑丰富多彩,变化多端,绝大部分属于以下几种类型:① 黄底型:鞘翅的底色为红或橙黄色,上有0~19个黑色斑点,这些黑色斑点的数目、大小及位置有显著的个体变异,它们既受遗传基因的支配,也受环境条件特别是蛹期温度的影响;② 二窗型:鞘翅底色为黑色,在左右翅的中上部各有1个较大的红或橙黄色斑点,斑点的位置、大小等有个体差异;③ 四窗型:鞘翅底色为黑色,左右翅各有两个红或橙黄色斑点,上边的一对较大,下边的一对较小;④ 花斑型:鞘翅的底色为黑色,上有红或橙黄色的斑点,一般为10或12个,这种类型在俄罗斯的阿尔泰地区很多,在日本也常见,但在我国则罕见。在野外,约99%的异色瓢虫属于以上4种,其他1%包括一些稀有的斑纹类型。

#### 【材料与用品】

##### 1. 材料

异色瓢虫。

##### 2. 用具及药品

恒温培养箱、烘箱、双筒解剖镜、放大镜、温度计、培养皿、白板纸、滤纸等。

雄蜂幼虫粉末、猪肝提取液或蚜虫、乙醚或氯仿等。

#### 【实验步骤】

##### 1. 异色瓢虫的人工饲养

异色瓢虫人工饲养的关键是人工饲料的种类和配方问题。雄蜂蛹是饲养异色瓢虫效果最好的人工饲料,人工饲养的赤眼蜂蛹和以猪肝—蔗糖为基础的人工饲料(表2-6)也可作为异色瓢虫的饲料。异色瓢虫规模化饲养的难题是人工饲料对瓢虫生殖力的负面影响,主要表现为产卵前期延长、产卵量少和孵化率低等。

表 2-6 猪肝—蔗糖人工饲料配方

单位:质量分数/%

配 方	鲜猪肝	蜂 蜜	蔗 糖	葡萄糖	啤酵母	蜂王浆	维生素 C
1	5	1	0	0	0	0	0
2	5	1	1	0	0	0	0
3	20	4	4	0	0	1.5	0.1
4	5	0	0	2	0	0	0
5	5	0	0	0	0.5	0	0



2. 异色瓢虫鞘翅斑纹的观察与遗传分析

中国境内的异色瓢虫鞘翅斑纹主要有黄底型、二窗型和四窗型,分别由复等位基因  $s$ 、 $S^c$  和  $S^{sp}$  支配,三者的显性程度为:  $S^c > S^{sp} > s$ 。

因此,黄底型的基因型为  $ss$ ,四窗型为  $S^{sp}S^{sp}$  或  $S^{sp}s$ ,二窗型为  $S^cS^c$ 、 $S^cS^{sp}$  或  $S^cs$ 。其中,在有些二窗型鞘翅的红色斑点里,常常能够看到 1 个甚至 2 个来自于黄底型基因  $s$  的黑色斑点,这是典型的嵌镶显性现象。

如果进一步观察这类黑底色鞘翅的瓢虫( $S^{sp}s$ 、 $S^cs$ )的自交后代,可以发现黄底型( $ss$ )分离出来,分离比符合孟德尔定律。上述观察和实验,既可用于说明基因型与表型的关系,也可作为分离定律的验证实验。

3. 异色瓢虫鞘翅斑纹与基因表达的特异性

异色瓢虫鞘翅的黑色部分与红色部分分别含黑色素和类胡萝卜素衍生物,这些色素的分布范围和布局主要由鞘翅斑纹基因决定。成虫刚刚羽化时,各类异色瓢虫的鞘翅均呈乳白色,其后,逐渐开始着色。

仔细观察鞘翅的着色过程,可以发现黑色素及类胡萝卜素衍生物都只有在特定的鞘翅部分出现。这表明,控制相应色素合成的基因仅在特定的时间(羽化开始后数小时)、特定的空间(鞘翅的黑色或非黑色部分)上表达。这种现象能够直观地说明基因特异性表达的生物学意义。

4. 异色瓢虫群体鞘翅斑纹表型与基因型频率的计算

异色瓢虫群体包括数种不同的鞘翅斑纹类型,它们之间可以自由交配,因而构成了一个典型的孟德尔群体。采集和利用即将群集越冬的异色瓢虫,可以计算、测定鞘翅斑纹型的复等位基因在群体中的相对频率。假设  $S^c$ 、 $S^{sp}$  和  $s$  基因频率分别为  $p$ 、 $q$  和  $r$ ,鞘翅斑纹型(表型)、基因型及基因频率关系如表 2-7。

表 2-7 异色瓢虫主要斑纹型与基因型频率的关系

色 斑 型	基 因 型	基 因 型 频 率	标 本 数
二窗型	$S^cS^c, S^cS^{sp}, S^cs$	$p^2 + 2p(q+r)$	$n_p$
四窗型	$S^{sp}S^{sp}, S^{sp}s$	$q^2 + 2qr$	$n_q$
黄底型	$ss$	$r^2$	$n_r$
合 计		1	$N$

因为 99% 以上的个体均属上述 3 种色斑型,故可使  $p+q+r \approx 1$ 。由此得出基因频率分别为:

$$p = 1 - \frac{\sqrt{n_q + n_r}}{\sqrt{N}}, \quad q = \frac{\sqrt{n_q + n_r} - \sqrt{n_r}}{\sqrt{N}}, \quad r = \frac{\sqrt{n_r}}{\sqrt{N}}$$

**【实验报告】**

对异色瓢虫有哪些新认识?

(刘林德)

## 实验 31 Southern 印迹杂交

**【实验目的】**

学习 Southern 印迹杂交的实验方法,理解其实验原理。

**【实验原理】**

不同来源的核酸分子,但具有互补序列或某一区段互补,经过变性、缓慢退火可重新结合成双链,成为杂交分子。这一过程称为核酸分子杂交。杂交分子的双方中,一般有一方的核苷酸序列已知且被人为标记。该标记能用特定方法检出,即为探针。探针是指经特殊化合物标记的特定的核苷酸序列,用于核酸分子杂交的探针有 DNA 探针及 RNA 探针。探针与互补的核苷酸序列形成杂交分子后也带有标记,可被检出,这样就会检测到与已知核酸同源的序列。

核酸分子杂交包括 Southern 印迹杂交和 Northern 印迹杂交。Northern 杂交是以 DNA 或 RNA 为探针,检测 RNA 链,用于检测特定基因的转录产物 mRNA。Southern 杂交是以 DNA 或 RNA 为探针,检测 DNA 链,来鉴定或分析特定基因的位置和大小。

Southern 印迹杂交由 Southern 于 1975 年建立,用于检测限制性内切酶切割的植物 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列,并可分析外源基因在植物染色体上整合情况,如拷贝数、插入方式以及外源基因在转化植株  $F_1$  代中的稳定性等问题。一般是将基因组 DNA 提取出来,用限制性内切酶酶解后,经琼脂糖凝胶电泳分离,DNA 各片段按分子大小依次分开排布在凝胶上,然后用碱处理凝胶,使各酶切 DNA 片段在凝胶上原位变性成为单链。在高盐条件下,利用印迹技术,通过毛细管虹吸作用,将单链 DNA 从凝胶中吸印至硝酸纤维素膜上,各片段在固相膜上的相互位置与在凝胶上相同,凝胶中 DNA 片段的相对位置在转移至滤膜的过程中保持不变,经烘干或紫外线照射处理,使印迹的各片段与固相膜牢固结合。经预杂交处理,掩盖膜上的非特异性杂交位点后,将膜放入含有单链或经变性处理成为单链的探针杂交液中,在适宜的条件下进行杂交。膜上与探针同源的单链序列与探针杂交成双链,从而使探针固定在相应位置上。外源基因与探针同源,凡含有外源基因序列的片段都可以发生杂交,形成带标记的特异性杂交体。最后根据探针的标记性质进行检出(放射性同位素标记的通过放射自显影检出,酶标记的则可通过酶反应检出),特异性杂交体的数量及位置将清晰而准确地显示出来(图 2-15)。

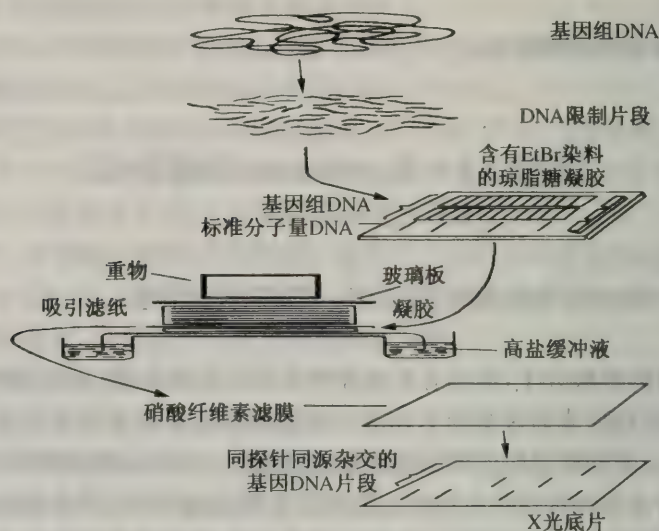


图 2-15

(引自朱玉贤等 2002)

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

高等植物的总 DNA 及探针。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

电泳槽、搪瓷方盘或大培养皿、量筒、烧杯、硝酸纤维素膜、玻璃板、普通滤纸、吸水纸、重物(约 500 g)、恒温烘箱、高压灭菌锅、PCR 仪、Eppendorf 管、移液器、紫外透射反射分析仪、放射性探测仪、杂交盒、杂交恒温箱、增感屏、低温冰箱。

##### (2) 试剂

1) 预杂交液 (Church Buffer) 终浓度为 7% SDS、1% BSA、1 mmol/L EDTA (pH 8.0)、0.25 mol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7.2)。做为溶剂, 配制 500 ml  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 取 70 ml 1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、360 ml 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、70 ml  $\text{H}_2\text{O}$ 。

2) 琼脂糖、变性液 0.4 mol/L HCL、转移液 0.4 mol/L NaOH、10×SSC 溶液或 20×SSC 溶液、10% SDS 溶液或 1% SDS 溶液、 $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP、无菌蒸馏水(无菌水)。

### 【实验步骤】

#### 1. DNA 片段的 Southern 印迹转移(碱转移法)

##### (1) 限制性酶切片段的琼脂糖凝胶分离

1) 取灭菌的 0.5 ml Eppendorf 管, 按顺序依次加入无菌水、酶缓冲液、植物总



DNA 10  $\mu\text{g}$ 、10 u 特定限制内切酶, 体积为 20  $\mu\text{l}$ , 混匀, 离心至管底, 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜充分酶切。

2) 根据要分离的 DNA 片段大小配置合适浓度的琼脂糖凝胶(含 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溴化乙锭), 将酶解产物进行电泳分离, 恒压电泳 10~16 h(电压 $<1\text{ V}/\text{cm}$ )。

### (2) 印迹

1) 将凝胶放入搪瓷盘或大培养皿中, 切去多余部分, 并切去一角以作样品顺序标记。加入 0.4 mol/L HCl 没过凝胶, 缓慢摇动 10~15 min, 使 DNA 变性, 溴酚蓝由蓝色变为橘黄色。

2) 将凝胶用无菌水冲洗 1~2 次, 再于 0.4 mol/L NaOH 中轻轻振荡中和 15 min 左右。

3) 剪取与凝胶同样大小的硝酸纤维素膜, 先用无菌水浸透 5 min, 再浸入 0.4 mol/L NaOH 中或 20 $\times$ SSC 溶液 5 min。

4) 取一搪瓷盘, 放入适量的 0.4 mol/L NaOH 溶液或 20 $\times$ SSC 溶液, 方盘上架一玻璃板, 玻璃板上平铺上一张洁净的滤纸, 滤纸两端要浸于 NaOH 溶液中, 玻璃板与滤纸间不能有气泡。

5) 将凝胶放到滤纸上, 让点样孔向下, 用玻璃棒驱除凝胶与滤纸之间的气泡。

6) 把处理好的硝酸纤维素膜准确地盖在凝胶上面, 用玻璃棒小心驱除凝胶与滤膜之间的气泡。将两张与膜同样大小的滤纸在 0.4 mol/L NaOH 溶液中浸湿, 将其一一放在膜上, 排除膜与滤纸之间、滤纸与滤纸之间的气泡。

7) 准备与膜大小基本相同或略大的拆叠好的吸水纸, 放在滤纸上面高 8~10 cm, 在吸水纸上放一块玻璃板, 在玻璃板上放上约 500 g 的重物, 水平放置, 室温下转移 12~20 h。注意, 中间要更换, 添加吸水纸。

8) 取出硝酸纤维素膜, 使 DNA 印迹面向下, 于 254 nm 紫外光下照射 5 min 后, 在滤纸上室温晾干, 用保鲜膜包好, -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 2. 探针的制备——随机引物标记法

在 Eppendorf 管中加入模板 DNA 10 ng~1  $\mu\text{g}$ (约 1~2  $\mu\text{l}$ )、随机引物 2  $\mu\text{l}$ , 加无菌水至 14  $\mu\text{l}$ , 在 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$  加热 3~5 min 后迅速置于冰浴中放置 5 min。然后依次加入 10 $\times$ Buffer(缓冲液) 2.5  $\mu\text{l}$ 、dNTP 2.5  $\mu\text{l}$ 、1  $\mu\text{l}$  Exo-free Klenow Fragment 酶, 加无菌水定溶至 22  $\mu\text{l}$ , 最后在杂交室中加入  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP(50  $\mu\text{Ci}$ ) 3  $\mu\text{l}$ , 在 PCR 仪上按以下程序进行: 37 $^{\circ}\text{C}$ , 20 min; 65 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ , 3 min。最后迅速置冰浴中 5 min。

### 3. 杂交

#### (1) 预杂交

将 DNA 膜(DNA 附着面向上)浸入 65 $^{\circ}\text{C}$  预热的预杂交液中(预杂交液的加入量以刚好没过膜为宜), 50~65 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中预杂交 4 h。

## (2) 杂交

将标记并已变性的探针加入预杂交液中, 50~65℃杂交过夜。

## (3) 洗膜

1) 室温条件下, 2×SSC/0.5%SDS 溶液中 5 min。

2) 室温条件下, 2×SSC/0.1%SDS 溶液中 15 min。

3) 37℃条件下, 0.1×SSC/0.5%SDS 溶液中 30~60 min。

4) 68℃条件下, 0.1×SSC/0.5%SDS 溶液中 30 min。

因膜及杂交情况洗膜的时间长短不一定。

用滤纸吸去膜表面水分, 用保鲜膜包裹; 用 Monitor 检测放射性强度, 在暗室中压上 X 光片, 两面覆以增感屏, -70℃曝光 2~7 d, 常规方法冲洗 X 片。

## 【实验报告】

1. 为什么在印迹转移过程中特别强调玻璃板与滤纸之间、滤纸与滤纸之间等不能有气泡?

2. 标记探针除了用随机引物法以外还有那些方法?

(王淑芳)

# 实验 32 质粒 DNA 的提取及酶切

## 【实验目的】

学习和掌握碱裂解法提取质粒的原理和方法。

## 【实验原理】

碱裂解法提取质粒是根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性染色体 DNA 在拓扑学上的差异来分离它们。在 pH 值介于 12.0~12.5 这个狭窄的范围内, 线性的 DNA 双螺旋结构解开而被变性。尽管在这样的条件下, 共价闭环质粒 DNA 的氢键会被断裂, 但两条互补链彼此相互盘绕, 仍会紧密地结合在一起。当加入 pH 4.8 的乙酸钾缓冲液, 恢复 pH 至中性时, 共价闭合环状的质粒 DNA 的两条互补链仍保持在一起, 因此复性迅速而准确。而线性的染色体 DNA 的两条互补链彼此已完全分开, 复性就不会那么迅速而准确, 它们缠绕形成网状结构, 通过离心, 染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA, 蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

## 【材料与用品】

1. 材料

含 pUC19 质粒的 *E. coli*。

2. 用具及药品

### (1) 仪器及用具

恒温培养箱、恒温摇床、台式离心机、高压灭菌锅、吸头、小指管、微量离心管。

### (2) 药品

葡萄糖、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、氢氧化钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙酸钾、冰乙酸、氯仿、乙醇、胰 RNA 酶、氨苄青霉素、蔗糖、溴酚蓝、酚、8-羟基喹啉、 $\beta$  巯基乙醇、盐酸(HCl)、EcoRI 酶。

### 3. 试剂

1) 溶液 I (solution I) 50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)Tris · HCl(pH 8.0)、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)。

2) 溶液 II (solution II) 0.2 mol/L NaOH、2% SDS,使用前等体积混合,现用现配。

3) 溶液 III (solution III)(pH 4.8) 若配 200 ml,三种成分的量分别为 5 mol/L 乙酸钾 120 ml、冰乙酸 23 ml 和 DDW 57 ml。

4) TE 缓冲液 10 mmol/L Tris · HCl,1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

5) 70%乙醇(放-20℃冰箱中,用后即放回)。

6) 胰 RNA 酶 将 RNA 酶溶于 10 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 中,配成 10 mg/ml 的浓度,于 100℃加热 15 min,缓慢冷却至室温,保存于-20℃。

7) 终止液 40%蔗糖、0.25%溴酚蓝、1%SDS。

8) 酚(见附录)。

### 【实验步骤】

#### 1. 提取质粒

1) 将 2~4 ml 含相应抗生素的 LB 液体培养基加入试管中,接入含 pUC19 质粒的 *E. coli*,37℃振荡培养过夜。

2) 将试管中摇好的菌体一般分 2~3 次倒入微量离心管(Eppendorf 管)中,7 000 r/min离心 1 min,弃去上清,使细胞沉淀尽可能干燥。

3) 将细菌沉淀悬浮于 200  $\mu$ l 溶液 I 中,充分混匀,室温放置 5 min。

4) 加 300  $\mu$ l 溶液 II (新鲜配制),盖紧管皿,混匀内容物,将离心管室温或冰上放置 5 min。

5) 加入 300  $\mu$ l 溶液 III,盖紧管口,颠倒数次使混匀。室温或冰上放置 5 min。

6) 12 000 r/min,离心 15 min,将上清转至另一离心管中。向上清中加入等体积(800  $\mu$ l)酚:氯仿(1:1)或氯仿(去蛋白),反复混匀,12 000 r/min,离心 5 min,将上清转移到另一离心管中。

7) 向上清加入预冷的异丙醇或 2 倍体积无水乙醇,混匀后,室温或-20℃冰箱放置 30 min。12 000 r/min 离心 10~15 min。倒去上清液,把离心管倒扣在吸



水纸上,吸干液体。

8) 用 0.5 ml 70% 乙醇洗涤质粒 DNA 沉淀两次,振荡并离心,倒去上清液,真空抽干或空气中干燥。

9) 加 30~50  $\mu$ l 无菌水或 TE 缓冲液,其中含有 20  $\mu$ g/ml 的胰 RNA 酶,37℃ 2~5 h 使 DNA 完全溶解,-20℃ 可保存数月。

## 2. 酶切

取 5  $\mu$ l DNA 溶液,加 1  $\mu$ l 酶切缓冲液,EcoRI 酶 1  $\mu$ l,无菌水补至总体积 10  $\mu$ l 体系,37℃ 保温 3 h,加终止液,准备下个实验进行电泳,分析质粒 DNA 的限制性酶切图谱。

## 【实验报告】

1. 碱裂解法提取质粒 DNA 需要注意哪些问题?
2. 除碱裂解法外,质粒 DNA 的提取,还有其他哪些方法?

(贺继临)

# 实验 33 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA

## 【实验目的】

学习琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的方法和技术。

## 【实验原理】

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷,在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质,相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷,因此它们能以同样的速度向正极方向移动。在一定的电场强度下,DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应,即 DNA 分子本身的大小和构型。具有不同的相对分子质量的 DNA 片段泳动速度不一样,可进行分离。DNA 分子的迁移速度与相对分子质量的对数值成反比关系。凝胶电泳不仅可分离不同相对分子质量的 DNA,也可以分离相对分子质量相同,但构型不同的 DNA 分子。如实验 32 提取的 pUC19 质粒,有 3 种构型:① 超螺旋的共价闭环质粒 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA); ② 开环质粒 DNA,即共价闭环质粒 DNA 的 1 条链断裂, (open circular DNA, ocDNA); ③ 线状质粒 DNA,即共价闭环质粒 DNA 的 2 条链发生断裂 (linear DNA, LDNA)。这 3 种构型的质粒 DNA 分子在凝胶电泳中的迁移率不同,因此电泳后呈 3 条带:超螺旋质粒 DNA 泳动最快,其次为线状 DNA,最慢的为开环质粒 DNA。

**【材料与用品】**

## 1. 材料

pUC19 质粒。

## 2. 用具及药品

## (1) 仪器

恒温培养箱、琼脂糖凝胶电泳系统(电泳仪、电泳槽、制胶板等)、台式离心机、高压灭菌锅、紫外线透射仪。

## (2) 药品

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、冰乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、溴酚蓝、蔗糖、琼脂糖、溴化乙锭、DNA marker。

## (3) 试剂

1) 1 000 ml 50×TAE(50 倍体积的 TAE 贮存液) Tris 242 g、57.1 ml 冰乙酸、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)100 ml,加 DDW 定容到 1 000 ml。

2) 凝胶加样缓冲液(6×) 溴酚蓝 0.25%,蔗糖 40%。

3) 琼脂糖、0.5 μg/ml 溴化乙锭溶液(EB)。

**【实验步骤】**

## 1. 制备琼脂糖凝胶

按照被分离 DNA 的大小,决定凝胶中琼脂糖的百分含量。

琼脂糖凝胶浓度/%	线性 DNA 的有效分离范围/kb
0.3	5~60
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.4~6
1.5	0.2~4
2.0	0.1~3

称取 0.3 g 琼脂糖,放入锥形瓶中,加入 30 ml 1×TAE 缓冲液,置微波炉或水浴或电热套中加热至完全溶化,取出摇匀,则为 1%琼脂糖凝胶液。

## 2. 胶板的制备

1) 取有机玻璃内槽,洗净,晾干,用橡皮膏将有机玻璃内槽的两端边缘封好。注意一定要封严,不能留缝隙。

2) 将有机玻璃内槽放置于一水平位置,并放好样品梳子。

3) 将冷到 60℃左右的琼脂糖凝胶液,加入万分之一或两万分之一 EB 混匀,缓缓倒入有机玻璃内槽,直至有机玻璃板上形成一层均匀的胶面。注意,不要

形成气泡,同时加 EB 一定要带一次性手套,以防 EB 对实验者污染造成伤害。

4) 待胶凝固后,取出梳子,取下橡皮膏,放在电泳槽内。

5) 加电泳缓冲液入电泳槽中。

### 3. 加样

用移液枪将已加入上样缓冲液的 DNA 样品加入加样孔,记录点样顺序及点样量。

### 4. 电泳

1) 接通电泳槽与电泳仪的电源。注意正负极,DNA 片段从负极向正极移动。DNA 的迁移速度与电压成正比,最高电压不超过 5 V/cm。

2) 当溴酚蓝染料移动到距凝胶前沿 1~2 cm 处,停止电泳。

### 5. 结果观察

在紫外灯(360 nm 或 254 nm)下观察染色后的电泳凝胶。DNA 存在处应显出橘红荧光条带。在紫外灯下观察时应戴上防护眼镜,紫外线对眼睛有伤害作用。注意以下三种情况的条带:① DNA 相对分子质量标准物(marker);② pUC19 质粒 DNA 经 *Eco*RI 完全酶解;③ pUC19 质粒 DNA 经 *Eco*RI 部分酶解。

### 【实验报告】

分析解释实验结果。

(贺继临)



## 第三部分

# 研究性实验

### 实验 34 调查人群中某一或某几种性状

#### 【实验目的】

1. 了解人类几种性状的遗传规律。
2. 掌握色盲的遗传机制。
3. 培养实验设计, 科普调查的能力。

#### 【实验原理】

由遗传因素引起的疾病称为遗传病。大多数遗传病是先天性病, 即在胎儿出生前由于染色体结构或数目异常或基因的点突变在婴儿出生时就显示症状, 如先天愚型、血友病、白化病、色盲(color blindness)。色盲指患者不能辨别红色和绿色, 是人类比较常见的隐性伴性遗传病, 也是人类遗传病研究得最早的一个性状。色盲的遗传是隐性的色盲基因  $c$ , 由 X 染色体携带, Y 染色体上没有它的等位基因。作为半合子的男性个体的 X 染色体上如果带有色盲基因( $X^cY$ )表型一定为色盲。而女性色盲患者的基因型则为  $X^cX^c$  的纯合体。由伴性遗传规律可知, 如果一个色盲的女子与一个正常色觉的男性婚配, 则他们的儿子都像他们的母亲一样表现色盲, 而所有的女儿都会像父亲一样表现正常。红色觉基因座与绿色觉基因座已定位在 X 染色体的  $X_{q28}$ 。

#### 【实验内容】

设计一个实验方案, 调查人群中的色盲、白化病、血友病、先天愚型性状, 记录原始数据, 绘出遗传系谱, 试推个体的基因型。

#### 【实验报告】

完成一篇调查论文。

(张爱民)

### 实验 35 观察不同诱变因素对染色体结构的影响

#### 【实验目的】

1. 了解不同诱变因素对遗传物质的效应及诱变机制。
2. 学习诱发植物染色体结构变异的方法。

### 3. 认识畸变的几种类型。

#### 【实验原理】

任何一个物种的染色体形态、结构和数目是相当稳定的,但绝非永恒不变。在自然条件下,某些环境因素的异常变化往往能引起植物染色体的形态、结构和数目变异。如果用物理、化学因素人为地处理植物,则可以大大提高变异频率。这类物理、化学因素被称为诱变因素或诱变剂。

目前应用最广而行之有效的物理诱变因素是辐射。辐射可分电离辐射与非电离辐射。电离辐射具有更高的能量,当与被照射物质起作用时,除能引起物质的激发外,还能引起电离。在高等植物诱变工作中主要是利用电离辐射。电离辐射是通过电离作用使染色体受到损伤,轻则造成基因结构的改变,重则造成染色体结构的断折。断折了的染色体在重新接合时难免发生差错,于是就出现结构变异。不同结构变异的出现需要不同的断折数。顶端缺失的出现只需要染色体断折一次;重复和易位的出现则需要两个染色体分别断折一次或一次以上,即至少两次断折。凡只要求断折一次就能出现的结构变异,它们的出现频率同辐射的剂量成正比。需要两次断折的结构变异,出现的频率都与辐射剂量的平方成正比。

从 20 世纪 40 年代成功地使用化学诱变剂以来,研究过的诱变剂已有很多种,然而能在栽培作物诱变中有实际应用价值的还为数不多。它们大都属于烷化剂,如甲基磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯(des)、乙烯亚胺(EI)、亚硝基乙基尿烷(NEU)以及亚硝基乙基脒(NEH)。除烷化剂以外,在植物中羟胺( $\text{NH}_2\text{OH}$ )也能引起染色体畸变。烷化剂带有一个或多个活性烷基,此烷基能够转移到其他分子电子密度极高的位置上去。这种通过烷基在分子内置换氢原子的作用,就叫烷化作用。烷化了的分子是高度不稳定的物质。Reiner 和 Zamenhof 证明 DNA 的磷酸基是烷化作用的最初反应位置,所形成的磷酸三酯是不稳定的,很快能水解成磷酸酯和去氧核糖,结果使 DNA 链断裂。Brooks 和 Lawley 证明了嘌呤和嘧啶碱基也发生烷化作用,碱基的烷化作用偶尔也导致结构的重排,使糖苷键断裂。去嘌呤后的 DNA 是易变的,在去嘌呤的位置上能打断糖—磷酸键。

经诱变因素处理过的材料,其细胞在有丝分裂过程中常常可以看到染色体黏连,着丝点区域断裂,破坏纺锤丝形成,染色体或染色单体的断裂,出现环状染色体以及“染色体桥”和落后染色体等异常现象。

在实际工作中,选择合适的剂量、浓度、处理的持续时间及温度也是很重要的。一般要求尽量减少对植物的生理损伤,提高遗传方面的效应,以有效地选择优良的变异类型和个体。

#### 【材料与用品】

##### 1. 材料

小麦、大麦、蚕豆、玉米等植物种子。

## 2. 用具及药品

### (1) 实验用具

显微镜、恒温箱、恒温水浴锅、剪子、镊子、刀片、酒精灯、烧杯、小指瓶、载玻片、盖玻片、滤纸、纱布、培养皿。

### (2) 药品

甲基磺酸乙酯、乙醇、1 mol/L 盐酸、0.05%秋水仙素、卡诺固定液、改良苯酚品红染色液、45%醋酸。

## 【实验步骤】

### 1. 辐射诱变的染色体结构变异

1) 将小麦、大麦、蚕豆或玉米等植物种子各分成4份,三份交辐射中心用 $\gamma$ 射线照射,剂量分别为1万、2万和3万伦琴,另一份作为对照。

2) 辐射后的种子连同对照分别放于25℃温箱内浸种发芽。

3) 待蚕豆初生根长至1.5 cm,小麦、大麦或玉米初生根长至0.5 cm,切下根尖于卡诺固定液中固定1~2 h。

4) 洗去固定液,在1 mol/L 盐酸60℃下水解10 min左右,立即放入冷的1 mol/L盐酸中。

5) 将根尖置于干净的载玻片中央,切下根尖分生组织,再覆一张载玻片对压后,滴一滴改良苯酚品红染色液10 min,加上盖玻片压片。

6) 观察后、末期细胞染色体。每处理观察10条根尖制片,每根尖观察10个以上后、末期细胞,统计其染色体畸变率。

种子辐射处理后统计有丝分裂中畸变数时,必须观察第一次有丝分裂周期中的畸变。因为畸变细胞的数量在以后的第二、第三次分裂周期中会逐渐下降,只有根据种子发芽后第一次有丝分裂周期所作的统计数,才能对不同诱变处理的结果进行可靠的比较。

### 2. 化学诱变剂诱发的染色体结构变异

1) 选小麦、大麦或玉米种子在25℃下发芽,待初生根长至0.6~1 cm时,用0.6%甲基磺酸乙酯溶液室温下分别处理1、2和3 h。

2) 自来水冲洗0.5 h后在25℃温箱中恢复培养20~24 h。

步骤同上。

## 【实验报告】

1. 按照一般科技论文的形式自行设表,统计不同处理根尖细胞的染色体畸变率。

2. 分析讨论:自发突变与诱发突变、不同材料、不同诱变剂、不同照射剂量、EMS的处理时间等对染色体结构变异的影响。

(刘 文)



## 实验 36 染色质的分离及组成成分分析

### 【实验目的】

1. 掌握染色质分离的方法。
2. 了解染色质组成成分分析的方法。

### 【实验原理】

染色质是遗传物质的载体,在间期细胞核中呈现分散状态。当细胞分裂时进一步螺旋化,折叠成染色体。它是真核生物核基因遗传和变异的物质基础。本实验以大鼠肝细胞为材料说明染色质制备的一般原理和方法。

先把细胞匀浆于一定的介质中,再经过过滤除去细胞碎片,用低速离心把核沉淀,去掉含有其他颗粒和可溶性蛋白及核酸的上液,用含有 EDTA 盐溶液洗核。用中性非离子型去污剂 TritonX-100 抑制核酸酶的活性,溶解膜状物质,去除染色质上膜物质的污染。EDTA(乙二胺四乙酸钠盐)是螯合剂,能和三价离子螯合,抑制 DNA 酶的活性,并可去除染色质上污染的蛋白质。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

大鼠肝细胞。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

冷冻离心机、刀匀浆器、玻璃匀浆器、医用纱布、电磁搅拌器、解剖用具、烧杯、量筒等一般玻璃器皿。

##### (2) 药品

1) A 液(匀浆缓冲液) 0.075 mol/L NaCl-0.024 mol/L EDTA, pH 8。

2) B 液(悬浮与洗涤缓冲液) 10 mmol/L Tris/HCl-0.2 mmol/L EDTA-0.1% TritonX-100, pH 8。

3) C 液 10 mmol/L Tris/HCl-0.2 mmol/L EDTA, pH 8。

4) D 液 1.7 mol/L 蔗糖-0.01 mol/L Tris/HCl-0.2 mmol/L EDTA, pH 8。

以上各种缓冲液均含有 0.1 mmol/L PMSF(甲苯磺酰氟, MW174),制备该溶液时可以先配制 50 mmol/L PMSF 贮液,即称取 0.87 g PMSF 溶于 100 ml 的异丙醇或 95%乙醇中即可,临用时按稀释比例加入缓冲液。

### 【实验步骤】

本实验采用 BONNER 法。

#### 1. 染色质的分离

全部操作都在 0~4℃ 下进行,全部试剂均存于冰箱中。

1) 把饥饿 24 h 的大白鼠断颈处死,剖腹取肝,剪成小块于冷生理盐水中,洗去血污。

2) 称 15 g 肝(约三只大白鼠肝脏)在冰浴上剪碎,加入 200 ml A 液和 1 ml 辛醇以消除泡沫。在刀匀浆器中匀浆,快速 1 min,慢速 1~2 min,每 15 间歇数秒。

3) 把匀浆液用四层纱布过滤。滤液经  $1\,500\text{ g}^*$  离心 10 min。弃去混浊的上液。

4) 沉淀加入 150 ml A 液,匀浆,使沉淀悬浮。悬浮液再经  $1\,500\text{ g}$  离心 10 min,沉淀再以 80 ml A 液洗涤两次,可得到较纯净的细胞核。

5) 将此核沉淀加入 80 ml B 液,在玻璃匀浆器中匀浆 10~15 次,破核,再经  $1\,500\text{ g}$  离心 10 min,获得粗染色质沉淀。然后再用 80 ml B 液匀浆,依次经  $4\,500\text{ g}$ 、 $12\,000\text{ g}$  各离心 10 min,反复洗涤染色质沉淀。

6) 把染色质沉淀加入 20 ml C 液,用玻璃匀浆器匀浆,电磁搅拌器搅拌 1 h。把悬浮液分成 4 份,每份 5 ml 铺在 25 ml D 液之上,经  $70\,000\text{ g}$  离心 3 h,即可获得纯化的染色质沉淀。

7) 倒去上清液,将沉淀悬浮在 C 液中,在  $30\,000\text{ g}$  离心 20 min,洗涤两次,以除去染色质上残留的蔗糖。或者将悬浮液对 C 液在冰箱中透析过夜,亦可除去蔗糖。

8) 本法纯化的染色质可用电镜观察,组成成分的定量分析、免疫反应以及 DNA 和染色质蛋白质(组蛋白和非组蛋白)的制备等实验。

## 2. 染色质纯度的鉴定

### (1) 紫外吸收的特征曲线

将染色质沉淀加入双蒸水(pH 8,用  $\text{NH}_4\text{OH}$  调)用刀匀浆器冰浴匀浆 2 min(快速),然后冰箱中电磁搅拌 0.5~1 h,经  $10\,000\text{ g}$  离心 30 min,可获得含纯染色质的上清液,最终使染色质稀释 30 倍。或者取染色质沉淀在  $0.1\text{ mmol/L}$  Tris/HCl(pH 8)缓冲液中悬浮,加入等体积的  $0.1\text{ mol/L}$  NaOH 溶液使之溶解,然后用双蒸水(pH 8)稀释 30 倍以上,即可用于测定。

用紫外分光光度计测定染色质溶液在  $190\sim 340\text{ nm}$ (或  $230\sim 340\text{ nm}$ )范围内的 OD 值变化。纯染色质的紫外吸收光谱,在  $320\text{ nm}$  测不到吸收值,而在  $220\text{ nm}$  和  $260\text{ nm}$  出现高吸收峰。根据经验数据,纯染色质的  $\text{OD}_{320}/\text{OD}_{260}$  比值应小于 0.05。

### (2) 溶解温度 $T_m$ 值的特征

各种来源的染色质  $T_m$  值是恒定的,并且比相应的 DNA 的  $T_m$  值高。如大鼠肝 DNA 的  $T_m$  值为  $68^\circ\text{C}$ ,常染色质的  $T_m$  值为  $81^\circ\text{C}$ ,异染色质  $T_m$  值近似  $86^\circ\text{C}$ 。

\*  $1\text{ RCF}=1\text{ g}=(1.18\times 10^{-5})^2\text{ r/min}$ ,下同。

溶解温度可用 257 nm 相对紫外吸收测定。

### (3) 形态观察

纯染色质呈黏液状,用醋酸洋红常规染色法,在光学显微镜下可以观察到疏散的网状纤维结构。电子显微镜下可以观察到直径为 100~300Å 粗细不等、交叉成网状的纤维,250~300Å 纤维上有螺旋斜纹和 100Å 纤维的念珠状结节,呈现出染色质的多级螺旋结构。

### (4) 染色质组成成分的分析(Sinclair 法)

1) 取染色质 1 g,加入预冷的 0.25 mol/L HCl - 0.9% NaCl 20 ml,充分匀浆后,在 4℃ 条件下电磁搅拌 1.5 h。12 000 g 离心 10 min,上清液用 0.52 mol/L HCl - 0.9% NaCl 补充到 25 ml。用 Folin 酚法测上清液组蛋白的含量,以牛血清白蛋白为标准。

2) 把 1) 的沉淀(去组蛋白染色质沉淀),用冷 10% TCA(三氯醋酸)洗两次后加入 10 ml 0.3 mol/L KOH 匀浆,匀浆液在 37℃ 水浴保温 1 h。冷却使沉淀完全,再用 5% PCA(HClO<sub>4</sub>,高氯酸)调 pH 1~2。12 000 g 离心 5 min,上清液用 0.3 mol/L KOH - HClO<sub>4</sub>(pH 1.5)补充到 25 ml。用地衣酚法测上清液 RNA 含量,以酵母 RNA 为标准。

3) 沉淀加 15 ml 10% PCA 匀浆,匀浆液在 70℃ 水浴保温 30 min。12 000 g 离心 10 min,上清液用 10% PCA 补充到 25 ml。用二苯胺法测定上清液 DNA 含量,以小牛胸腺 DNA 为标准。

4) 沉淀用适量 0.05 mol/L 或 0.1 mol/L NaOH 溶解(25℃),12 000 g 离心 5 min,上清液用 0.05 mol/L NaOH 补充至 25 ml,其中的非组蛋白用 Folin 酚法测定,以牛血清蛋白为标准。

5) 根据 DNA、组蛋白、RNA 和非组蛋白的含量,以 DNA 为 1,计算出大鼠肝染色质各组分的比值。

## 附 1

### FOLIN 酚法测定蛋白质含量

#### 一、原理

蛋白质在碱性条件下与铜形成复合物,然后又与钨酸钠-钼酸钠混合物产生蓝色反应,在 750 nm 有最大吸收。若蛋白质浓度超过 25 μg/ml 时,应在 500 nm 测定。本法灵敏,可测出 0.2 μg/ml 的蛋白质。

#### 二、试剂

##### 1. 试剂甲

使用前将 4% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 0.2 mol/L NaOH 等体积混合,1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O



和 2% 酒石酸钾钠等体积混合。然后将两者按 50 : 1 混合。当天使用。

## 2. 试剂乙 (Folin 酚试剂)

在 2 000 ml 的磨口回流装置内加入 100 g 钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、25 g 钼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、700 ml 蒸馏水, 再加 50 ml 85% 磷酸及 100 ml 浓硫酸, 充分混合后, 以小火回流 10 h。再加入 150 g 硫酸锂 ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ )、50 ml 蒸馏水及溴液数滴。然后开口继续沸腾 15 min 以驱除过量的溴。冷却后定容到 1 L。过滤后, 呈绿色, 置于棕色试剂瓶中冰箱保存。使用时用标准氢氧化钠溶液滴定, 酚酞为指示剂。最后约稀释 1 倍, 浓度即为 1 mol/L。存于冰箱中可长期保存。

## 3. 蛋白质标准液 (先用定氮法确定蛋白质纯度)

用牛血清白蛋白配成 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的水溶液。

# 三、实验步骤

## 1. 绘制标准曲线

按 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 往试管中加入蛋白质标准液, 然后各管加双蒸水至 1 ml。再加试剂甲 5 ml 混匀, 30℃ 保温 10 min, 加试剂乙 0.5 ml, 快速混匀, 30℃ 保温 30 min, 在 500 nm 测光密度。每种蛋白质标准浓度测两管, 取平均值。以蛋白质浓度为横坐标, 光密度为纵坐标, 绘制标准化曲线。

## 2. 样品的测定

按下表顺序进行, 在 500 nm 下测光密度。

	HP		NHP		对 照
No	1	2	3	4	5
样品/ml	0.05	0.1	0.05	0.1	0
D. W. /ml	0.95	0.9	0.95	0.9	1
试剂甲/ml	5	5	5	5	5
30℃ 保温 10 min					
试剂乙/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
快速混匀 30℃ 保温 30 min					
OD <sub>500</sub>					

## 3. 计算

1) 查标准曲线得蛋白质浓度可测定范围是 25~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白质。

2) 标准液标准值对比

$$\text{蛋白质浓度} = \frac{\text{待测液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}}{\text{标准液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}}$$

$$\times \text{标准液蛋白质浓度} \times \text{稀释倍数}$$

## 附 2

## 二苯胺法测 DNA 含量

## 一、原理

DNA 与强酸共热分解为嘌呤碱基、脱氧核糖和脱氧嘧啶核苷酸。脱氧核糖在酸性条件下又脱水生成  $\omega$ -羟基- $\gamma$ -酮基戊醛,和二苯胺作用形成蓝色物质,在 595 nm 有最大吸收,用小牛胸腺 DNA 为标准,进行 DNA 含量测定。

## 二、试剂

## 1. 二苯胺试剂

4 g 二苯胺溶于 400 ml 冰乙酸中,再加 40 ml  $\text{HClO}_4$ 。使用前取 100 ml,加入 1 ml 1.6%乙醛。

## 2. DNA 标准曲线(用定磷法确定 DNA 纯度)

取小牛胸腺 DNA,以 0.01 mol/L NaOH 溶液配制成 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 三、实验方法

## 1. 绘制标准曲线

取 10 支试管,分成两组,各加 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml DNA 标准液,加双蒸水到 2 ml。另取 2 支试管加入双蒸水为对照。各管加入 4 ml 二苯胺试剂,混匀,60℃保温 1 h。冷却后于 595 nm 处测光密度,取平均值。以 DNA 浓度为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制标准曲线。DNA 在 40~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围与光密度值成正比关系。

## 2. DNA 定量测定

步骤同上,只是待测样品的加样量为 0.05 ml 和 0.1 ml。

## 3. 计算

1) 查标准曲线,求得 DNA 浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

2) 用标准液标准值对比:

$$\text{DNA}(\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\text{待测液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}}{\text{标准液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}} \times \text{标准液的 DNA 浓度} \times \text{稀释倍数}$$

## 附 3

## 地衣酚法测定 RNA 含量

## 一、原理

RNA 和浓盐酸共热被分解为嘧啶核苷酸、嘌呤碱基和核糖,核糖又脱水成糖

醛,后者在三价铁离子催化下,与地衣酚形成鲜绿色,在 670 nm 有最大吸收值,可测其浓度,RNA 浓度在 20~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  与其光密度值成正比。

## 二、试剂

### 1. 地衣酚试剂(Oricinol)

称 50 g 地衣酚溶于 50 ml 0.1%  $\text{FeCl}_3$ -浓 HCl 中。

### 2. RNA 标准液(用定磷法测 RNA 纯度)

取酵母 RNA 配成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溶液。

## 三、实验方法

### 1. 标准曲线的制定

取 10 支试管分成两组,分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml RNA 标准液,再加双蒸水至 2.5 ml。另取 2 支试管加入 2.5 ml 双蒸水为对照。每管均加入 2.5 ml 地衣红酚试剂,混匀。沸水浴 20 min,冷却后于 670 nm 处测 OD 值,取两组平均值。以 RNA 浓度为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制标准曲线。

### 2. 样品 RNA 的定量测定

方法同上,只是样品加入量为 1 ml 和 2.5 ml,两组同时测定。加双蒸水补足 2.5 ml 后再加地衣酚试剂 2.5 ml。沸水浴 20 min,冷却后测  $\text{OD}_{670}$ 。

### 3. 计算

1) 查标准曲线求得 RNA( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。可测范围为 20~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2) 用标准液标准值对比。

$$\text{RNA}(\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\text{待测液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}}{\text{标准液 OD 值} - \text{对照液 OD 值}}$$

$\times \text{标准液的 RNA 浓度} \times \text{稀释倍数}$

## 【实验报告】

1. 绘出大鼠肝细胞染色质的紫外吸收特征曲线(190~340 nm),计算出  $\text{OD}_{320}/\text{OD}_{260}$  比值。

2. 根据染色质各组成成分的含量计算出大鼠肝染色质各组分的比值。

(郭善利 周国利)

## 实验 37 某种生物的染色体组型分析

### 【实验目的】

利用染色体组型分析的方法,研究任何一个未知动植物材料的染色体组成,分析其染色体组型,了解染色体组型分析的意义。



### 【实验原理】

见实验 10。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

任选一种动植物材料,制成染色体玻片标本,染色体要分散均匀,互不重叠。

#### 2. 用具及药品

剪子、镊子、塑料直尺、硬板纸、浆糊、显微镜、测微尺、圆规、摄像及暗室冲扩设备。

### 【实验步骤】

按实验 10 的方法步骤进行。

### 【实验报告】

搞清你所选用材料的染色体组型,写出该物种的染色体组型(核型)公式,并将全部实验过程写成研究报告。

(赵建萍 张爱民)

## 实验 38 DNA 重组分子的构建与筛选

### 【实验目的】

学习基因克隆的基本技术,学会设计简单的 DNA 重组分子的构建方案。

### 【实验原理】

构建重组 DNA 分子是基因工程的基本技术,包括目的基因和载体 DNA 的限制酶酶切、DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 的回收、DNA 重组分子(重组体)的构建、重组分子转化宿主细胞以及重组体的筛选等部分。可以根据实际情况,选用合适的目的基因和载体进行实验。

本实验中选用来自于烟草的锰超氧化物歧化酶(MnSOD)cDNA 基因,其上游、下游分别有 *Eco*RI、*Sal*I 限制酶的单一位点。*E. coli* 热激诱导表达载体 pBV221 的多克隆位点有 *Eco*RI、*Sal*I 限制酶位点。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

烟草的锰超氧化物歧化酶(MnSOD)cDNA 基因、质粒 pBV221、*E. coli* JM109。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

电泳槽、高压灭菌锅、PCR 仪、Eppendorf 管、移液器、离心管、电热恒温水浴

锅、冷冻离心机、紫外透射反射分析仪、电子天平、玻璃试管、冰箱、超净工作台。

## (2) 试剂

*Eco*RI、*Sa*I 限制酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、GeneClean 回收试剂盒、0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>、LB 培养基、抗生素。

## •【实验步骤】

### 1. 质粒的酶切

在 20~40  $\mu$ l 的反应体系中,加入 0.2~1  $\mu$ g 的质粒 DNA、酶的反应缓冲液、5~10 U 的限制酶,用水补足体积。37℃(最适反应温度非 37℃的酶除外)保温 2~4 h。琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

### 2. Gene Clean 方法从琼脂糖凝胶上回收 DNA 片段

1) 紫外灯下,切取含所需 DNA 条带的凝胶块并测其质量。

2) 按照 1 : 2.5~3.0(质量克数/体积 ml)加入 NaI 溶液,55~65℃温育 5 min,使凝胶充分溶解于 NaI 溶液。

3) 加入 5  $\mu$ l 充分混匀的 Glassmilk(每 5  $\mu$ l 可吸附 5  $\mu$ g DNA),室温放置 30 min,并不断摇动。

4) 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,用 100  $\mu$ l NewWash 溶液洗涤沉淀;12 000 r/min 离心 1~2 min。按上述操作重复 3 次,最后弃上清,烘干沉淀。

5) 根据回收的 DNA 量加入适当的水溶解,45~65℃温育 3~5 min,促使 Glassmilk 释放所吸附的 DNA。

6) 13 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,备用。

### 3. 连接反应

在 10  $\mu$ l 的连接体系中,加入外源插入片段 150~200 ng、载体片段约 100 ng、1  $\mu$ l 连接酶缓冲液、1  $\mu$ l T<sub>4</sub>DNA 连接酶,用水补足体积,14~16℃连接 10~16 h 或过夜。

### 4. *E. coli* 感受态细胞的制备

1) 挑取 *E. coli* JM109 的单菌落,接种于 5 ml LB 液体培养基中,37℃振荡培养 12 h。

2) 取 1 ml 菌液加入 100 ml LB 液体培养基中,扩大培养约 2 h。

3) 将菌液在冰上放置 15 min,无菌条件下倒入 50 ml 离心管中,4℃,3 500 r/min 离心 5 min。

4) 弃上清,在冰浴上加入 8 ml 预冷的无菌 CaCl<sub>2</sub>(0.1 mol/L)轻摇使细菌悬浮。

5) 4℃,3 500 r/min 离心 5 min,弃上清。

6) 用 1 ml 预冷的无菌 CaCl<sub>2</sub>(0.1 mol/L)重新悬浮细胞,200  $\mu$ l/份分装到预冷的无菌 Eppendorf 管中,4℃保存备用,在 1 周内转化率不降低。

### 5. *E. coli* 的转化

- 1) 取适量连接产物加到分装的感受态细胞中,混匀,冰浴 30 min。
- 2) 42℃热激 90 s,再冰浴 2~3 min。
- 3) 加入 800  $\mu$ l LB 培养基,于 37℃振荡培养 1 h。
- 4) 取适量菌液涂布 LB 平板(含有抗生素),室温晾干后,于 37℃倒置过夜培养。
- 5) 观察菌落的生长情况。

### 6. 重组体的筛选

- 1) 挑取转化平板上的单克隆,接种于 5 ml LB 液体培养基中,37℃振荡培养 12 h。
- 2) 提取质粒 DNA。
- 3) 进行 PCR 检测或酶切检测。

### 【实验报告】

按上述实验步骤构建含有 MnSOD cDNA 基因的 pBV221 重组 DNA 分子。

(王淑芳)

## 实验 39 *E. coli* 营养缺陷型菌株的 诱发和筛选

### 【实验目的】

了解紫外线的诱发机制,学会紫外线诱变的一般方法,掌握微生物突变型的筛选。

### 【实验原理】

突变型的获得是许多遗传学研究工作的首要条件。突变可自发形成,也可诱变产生,诱发突变一般分为化学诱变和物理诱变。紫外线是微生物诱变中常用的物理诱变剂,主要能使 DNA 链中两个相邻的嘧啶核苷酸形成二聚体而影响 DNA 的正常复制,从而造成基因突变。Kelner(1949)在灰色链孢霉(*Streptomyces griseus*)中首先发现把经紫外线照射的微生物立即暴露于可见光下时,就可出现明显降低其死亡率的现象,即光复活作用。后来在许多微生物中都陆续得到了证实,最明显的是在 *E. coli* 实验中。这主要是因为细菌体内存有一套修复系统,在有光的条件下光解酶(photolyase)可以将嘧啶二聚体在原位裂开而使 DNA 链在该处恢复正常。所以在用紫外线处理时及处理后的培养过程都应避免可见光照射(可在红光下进行操作)。

诱变处理必须选择合适的剂量。剂量的表示有两种,即绝对剂量和相对剂量。



绝对剂量的单位以尔格/cm<sup>2</sup>表示,一般用相对剂量。相对剂量与诱变源和处理微生物间的距离、诱变源(紫外灯)的功率以及处理的时间这三个因素有关。前两个因素是固定的,所以要通过处理时间控制诱变剂量。各种微生物的处理最适剂量是不同的,须经预备实验确定。

细菌经诱变处理后,若发生基因突变,丧失了合成某一物质(如氨基酸、维生素、核苷酸等)的能力,即不能在基本培养基上生长,必须补充某些物质才能生长。从野生型经诱变筛选得到的菌株,称为营养缺陷型。营养缺陷型菌株的筛选一般要经过诱变、淘汰野生型、检出和鉴定营养缺陷型四个环节。

之所以要经淘汰野生型,是因为在诱变后的存活个体中,营养缺陷型的比例一般较低,通常只有百分之几至千分之几。通过淘汰为数众多的野生型菌株,从而达到“浓缩”极少数营养缺陷型的目的。细菌中常用的浓缩法是青霉素法。青霉素是杀菌剂,只杀死生长的细胞,对不生长的细胞没有致死作用。所以在含有青霉素的基本培养基中野生型能生长而被杀死,缺陷型不能生长被保存得以浓缩。

检出缺陷型的方法有逐个检出法、夹层培养法、限量补充培养法、影印平板法,其中逐个检出法较为常用。这种方法是把经过浓缩的缺陷型菌液接种在完全培养基上,待长出菌落后将每一菌落分别接种在基本培养基和完全培养基上,使两个平板上的菌落位置严格对应。经培养后,如果在完全培养基某一位置上长出菌落,而在基本培养基相应位置上却不长,说明此乃营养缺陷型。

经初步确定为营养缺陷型的菌,还须借生长谱法(auxanography)进一步鉴定是哪一种化合物的缺陷型。具体做法是在同一培养皿的几个标定位置上分别放置微量待鉴定缺陷型所需营养物,如氨基酸、微生物、碱基等,在适宜条件下培养后,若发现某一营养物的周围有生长圈,就说明此菌就是该营养物的缺陷型。

### 【材料与用品】

#### 1. 材料

*E. coli*K<sub>12</sub>的野生型菌株、*E. coli* K<sub>12</sub>SF<sup>+</sup>。

#### 2. 用具及药品

##### (1) 用具

培养皿(9 cm)、三角烧瓶(150 ml)、吸管(1.5 ml)、离心管。

##### (2) 培养基

1) 肉汤液体培养基 牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5 g、蒸馏水 100 ml, pH 7.2, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

2) 肉汤液体培养基(2E) 牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5 g、蒸馏水 50 ml, pH 7.2, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

3) 基本液体培养基 2 ml Vogel50、葡萄糖 2 g、蒸馏水 98 ml、pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 30 min。

4) 基本固体培养基 琼脂2 g、基本液体培养基100 ml, pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 30 min。

5) 无 N 基本液体培养基  $K_2HPO_4$  0.7 g (或  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.92 g)、 $KH_2PO_4$  0.3 g、柠檬酸钠  $\cdot 3H_2O$  0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g、 $(NH_4)_2SO_4$  0.2 g、葡萄糖 2 g、蒸馏水 100 ml, pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 30 min。

6) 2 N 基本液体培养基  $K_2HPO_4$  0.7 g (或  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.92 g)、 $KH_2PO_4$  0.3 g、柠檬酸钠  $\cdot 3H_2O$  0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g、 $(NH_4)_2SO_4$  0.2 g、葡萄糖 2 g、蒸馏水 100 ml, pH 7.0, 0.056 MPa 高压灭菌 30 min。

7) 混合氨基酸和混合维生素及核苷酸的配制 氨基酸(包括核苷酸)分 7 组(I~VII), 其中 I~VI 组每组有 6 种氨基酸(包括核苷酸), 每种氨基酸(包括核苷酸)等量研细充分混合; 第七组是脯氨酸, 因为这种氨基酸容易潮解, 所以单独成一组。

I: 赖、精、甲硫、半胱、胱、嘌呤。

II: 组、精、苏、羟脯、甘、嘧啶。

III: 丙、甲硫、苏、羟脯、甘、丝。

IV: 亮、半胱、谷、羟脯、异亮、缬。

V: 苯丙、胱、天冬、甘、异亮、酪。

VI: 色、嘌呤、嘧啶、丝、缬、酪。

VII: 脯。

把维生素  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_6$ 、泛酸, 对氨基苯甲酸(BAPA), 烟碱酸及生物素等量研细, 充分混合, 配成混合维生素。

### (3) 生理盐水

NaCl 0.85 g, 蒸馏水 100 ml, 0.105 MPa 高压灭菌 15 min。

## 【实验步骤】

### 1. 菌液制备

1) 实验前 14~16 h, 挑取少量  $K_{12}SF^+$  菌, 接种于盛有 5 ml 肉汤培养液的三角瓶中, 置 37°C 培养过夜。

2) 第二天添加 5 ml 新鲜的肉汤培养液, 充分混匀后, 分装 2 只三角瓶, 继续培养 5 h。

3) 将两只三角瓶的菌液分别倒入离心管中, 离心(3 500 r/min) 10 min。

4) 倒去上清液, 打匀沉淀。其中一管吸入 5 ml 生理盐水, 然后倒入另一离心管, 两管并成一管。

### 2. 诱变处理

1) 吸取上述菌液 3 ml 于培养皿中, 将培养皿放在 15 W 的紫外灯下, 距离为 28.5 cm。

2) 处理前先开紫外灯稳定 30 min, 将待处理的培养皿连盖放在灯下灭菌 1 min, 然后开盖处理 1 min。照射完毕先盖上皿盖, 再关紫外灯。

3) 吸 3 ml 加倍肉汤培养液到上述处理后的培养皿中。置 37℃ 温箱内, 避光培养 12 h 以上。

### 3. 青霉素法淘汰野生型

1) 吸 5 ml 处理过的菌液予以灭菌的离心管, 3 500 r/min 离心 10 min。

2) 倒去上清液, 打匀沉淀, 加入生理盐水, 离心洗涤 3 次, 加生理盐水到原体积。

3) 吸取经离心洗涤的菌液 0.1 ml 于 5 ml 无氮基本培养液, 37℃ 培养 12 h。

4) 培养 12 h 后, 按 1:1 加入 2 N 基本培养液 5 ml, 称取青霉素钠盐, 使青霉素在菌液中的最终浓度为 1 000 单位/ml, 再放入 37℃ 温箱中培养。

5) 先从培养 12、16、24 h 的菌液中各取 0.1 ml 菌液倒在两个灭菌培养皿中, 再分别倒入经融化并冷却到 40~50℃ 的基本及完全培养基, 摇匀放平, 待凝固后, 放入 37℃ 温箱中培养。培养皿上注明取样时间。

### 4. 缺陷型的检出

1) 以上平板培养 36~48 h 后, 进行菌落计数。选用完全培养基上长出的菌落数大大超过基本培养基的那一组, 用接种针挑取完全培养基上长出的菌落 80 个, 分别点种于基本培养基与完全培养基平板上, 先基本培养基、后完全培养基, 依次点种, 放 37℃ 温箱培养。

2) 培养 12 h 后, 选在基本培养基上不生长、而在完全培养基上生长的菌落, 再在基本培养基的平板上划线, 37℃ 温箱培养, 24 h 后不生长的可能是营养缺陷型。

### 5. 生长谱鉴定

1) 将可能是缺陷型的菌落接种于盛有 5 ml 肉汤培养液的离心管中, 37℃ 培养 14~16 h。

2) 培养 16 h 后, 3 500 r/min 离心 10 min, 倒去上清液, 打匀沉淀, 然后离心洗涤 3 次, 最后加生理盐水到原体积。

3) 吸取经离心洗涤的菌液 1 ml 于一灭菌的培养皿中, 然后倒入融化后冷却至 40~50℃ 的基本培养基, 摇匀放平, 待凝, 共做两皿。

4) 在 2 只培养皿的皿背划分 8 个区, 依次放入混合氨基酸(包括核苷酸), 混合维生素和脯氨酸(加量要很少, 否则会抑制菌的生长), 然后放 37℃ 温箱培养 24~48 h, 观察生长圈, 并确定是哪种营养缺陷型。

### 【实验报告】

1. 完成实验报告, 包括本次实验的意义、材料与方法、结果、分析与讨论。
2. 紫外线处理后的菌液为什么要避光培养?

(赵建萍)





# 附 录

## 附录 1 实验室工作规程

### 1. 实验规则

- 1) 要有严肃、认真的科学态度,诚实、仔细地对待科学实验。
- 2) 实验前认真预习实验内容,列出实验步骤的程序示意图(流程图),标出重点和难点。
- 3) 自觉遵守课堂纪律。不大声喧哗,不随处扔纸屑、火柴头及其他脏物,保持实验室安静整洁。
- 4) 按照实验教师的讲解进行实验操作,既要独立进行又要与同组同学默契配合。
- 5) 随时把实验现象记录在实验记录本上,不可记在散纸片上。遇到疑难问题主动请教,按时交实验报告。
- 6) 爱护仪器、设备及用具。如有损坏或遗失,及时向教师报告,说明原因并请求补齐。
- 7) 注意节俭。按需要量取用药品、试剂、蒸馏水、实验材料和其他易耗品。用过的废物、废液倒入指定的盛留器中。
- 8) 公用试剂和用具用后要及时放回公用场所,以免影响其他同学使用。
- 9) 注意安全。使用挥发性试剂、有毒物品、强酸强碱时,切勿将试剂溅到身体上;使用易燃物品时不得靠近火焰;漏电的电器设备不能使用。遇到异常情况要及时报告。
- 10) 值日生负责实验室的卫生、安全及服务性工作,并在离开实验室前检查好水电门窗。

### 2. 显微镜的正确使用与保养

#### (1) 显微镜的使用

- 1) 搬动显微镜时,应一手握镜臂、一手托镜座,轻拿轻放。从箱中取显微镜时,切不可将显微镜拖出。放置显微镜时,应先放稳镜座的一侧再慢慢放下其余部分,不能使镜座底部一起与桌面或箱底面接触。放置显微镜的位置不能太靠近桌边。总之,一切会引起显微镜强烈震动、碰撞、滑落乃至损伤的可能情况均要时刻注意避免。

2) 把显微镜放到实验台后,先用纱布将显微镜的机械系统尤其是载物台擦拭干净。如果是曾经长期闲置的显微镜,除了用纱布或软毛刷擦拂镜身的灰尘污物外,还要用吸耳球将各处缝隙及镜头上的灰尘、纤维等吹去,然后再用擦镜纸将目镜、物镜、反射镜或光源灯上的滤光片等表面擦拭洁净。擦镜时只能顺着一个方向多次抹擦,不能往复或旋转抹擦。最后再用细丝绸把镜头擦拭一次,便可接通电源对光。

3) 对光时,先转动物镜转换台将低倍物镜移入光路(不可直接用手来回扳弄物镜筒),再开大集光器上的光阑。不带光源的显微镜可以通过调节反射镜和集光器进行对光;自带光源的显微镜,打开开关后,通过调节集光器对光。

4) 对光后,将洁净的待观察玻片标本固定在载物台上。镜检时,应先用低倍镜观察,然后转换到高倍镜。在使用高倍镜观察时,一定注意镜头与载物台之间的工作距离:首先降低载物台(或升高镜筒),然后旋动物镜转换台,使物镜镜头靠近标本,然后降低载物台或升高镜筒。注意,只能用细准焦螺旋轻而缓的调焦,否则极易损坏所检标本,严重的还会损伤物镜镜头。如换成高倍镜后视野亮度不够,应重新调整光阑开孔的大小、集光器的高低以及灯泡的亮度。

5) 调换观察标本,应先把高倍物镜换成低倍物镜,降下载物台,调换后重新调焦。

6) 油镜的使用:按照由低倍到高倍的顺序,用高倍镜观察清楚标本后,将需要进行更细致观察的部位移到视野中心,移开高倍镜头,在油镜未到定位时,滴一滴香柏油在盖玻片的预定位置上。之后,使油镜进入定位,与油接触,极轻缓地旋转细调至物像清晰。滴油时避免油滴形成气泡,如有气泡应将其排除。观察完毕后,立即用擦镜纸将油镜头及标本上的油擦去,然后用擦镜纸蘸少许镜头清洁剂(或二甲苯)擦拭。转动物镜转换台,将低倍物镜移入光路,再进行其他镜检项目。

7) 用完显微镜后,取下玻片标本,先将机械部分尤其是载物台擦拭干净。然后,调低灯泡亮度,断开电源,降下集光器并把光阑调小,将载物台(或镜筒)降至最低点,转动物镜转换台,使物镜头不正对集光器。最后,按要求把显微镜搬回存放处。

## (2) 使用显微镜时应注意的几个问题

1) 使用显微镜观察时,双眼都应张开,以减轻眼睛的疲劳。如用单筒显微镜,可用两眼轮换观察。如需绘图,则用左眼镜检,用右眼看绘图纸,边看边绘。

2) 使用双筒显微镜时,双眼视力不同者应该注意:先用右眼看到清晰的图像,再旋转左侧目镜使左眼也能看到同样清晰的图像。这样可以减轻眼睛的疲劳。

3) 换成高倍镜观察后,有时将细调旋转到行程终点也不能使图像清晰。此时应先拉开镜头与标本之间的距离,然后倒转细调,重新调整一下粗调之后再用细调



将图像调清晰。

4) 使用显微镜时,切不可让染料或其他试剂弄脏镜头和载物台,如有玷污,必须随时用擦镜纸或纱布擦拭干净。

5) 实验中间,暂时停止镜检,进行制片或其他操作步骤时,应随手把光源灯关上,以免发生意外。

### (3) 显微镜的维护和保养

1) 显微镜是比较精密的光学仪器,使用时必须注意防碰、防潮湿、防药品侵蚀。

2) 使用中如操作不当,常常会出现一些小故障,如灯泡不亮、光源射出的光不全部进入视野或视野不正、标本夹松动、物镜转换台松动、调焦失灵、升上去的载物台或镜筒自动下滑、显微镜外表很洁净而视野里很脏等。一旦发现问題,应报告教师以便及时维修或调换显微镜,以免影响实验进程或进一步损坏显微镜。

3) 显微镜要与化学药物分开放置,严禁混藏。

4) 镜箱内干燥剂应定期更换,以确保干燥剂处于干燥状态。

5) 定期检修保养显微镜,以保证其一直处于良好状态。

## 3. 实验报告的写作要求

### (1) 写作要求

所谓试验,就是在一定条件下,排除各种次要因素,突出主要因素,让现象以纯粹的典型方式重现。而实验报告,则是将实验的全部过程和结果写成文字材料。尽管各类实验报告从内容上看千差万别,但从写作的角度来看,一个实验报告是否合格,应看它是否符合如下五项原则:

1) 正确性原则:实验报告的原理、方法、数据及结论都是正确无误的,同时也要求实验报告的表达方式是正确无误的。

2) 客观性原则:不仅抱着客观的态度观察和记录现象,同时在写作时也应当尽可能客观地、忠实地反映试验的结果。

3) 公正性原则:实验者不能带着某种偏见去观察和理解实验现象,这样,在描述试验和报道试验的结论时才能表现出公正的态度。

4) 确证性原则:指实验的结果是能够被证实的,亦即任何人按给定的条件去重复实验,都一定能观察到同样的现象并能得到同样的结果。

5) 可读性原则:指实验报告符合语法和句法规范,而且具有简洁明晰的风格。

要完全符合上述五项原则并不是轻易就能做到的。况且,单纯从写作上要求对实验做客观报告是不够的,还应该要求实验者具有熟练的实验操作技术、细心观察实验现象、详细写好观察记录、用正确的方法去分析和整理试验结果等等。

## (2) 写作格式

实验报告的格式多种多样,一般分为题目、目的和要求、实验原理、材料与方法、实验结果、讨论和结论等部分,有时也可以把几个部分组合在一起来写。

1) 题目:所有的实验都有个题目,应该位于实验报告的顶端。

2) 目的和要求:为什么要做本实验?应达到的目标有哪些?实验的意义和作用何在?这些问题都需要实验者用概括性语言来描述,通常点到即可,在较重要的地方也可稍作说明。这一部分也可以用引言来包括或代替。

3) 实验原理:是对实验依据的理论所作的简要说明。原理部分的主要内容应包括简略介绍实验设计的重要概念、实验依据的基本理论及据此推演出的重要结果。如果能对实验中试图证明的内容进行一下粗略的描述则更好。

4) 材料和方法:介绍所用材料的名称(学名)、出处及实验中应用的特殊方法。这一部分的描述要简洁而明晰,以便他人能够重复,但是决不能照抄指导书上所列的实验准备和试验步骤。

5) 实验结果:这一部分连同后面的讨论是试验报告的主体。一般在写作前应将数字、图表整理好;写作时分好类、按一定顺序安排并加以必要的说明。要求是:必须如实地描写现象,不许有任何夸张;引用的数字图表必须真实可靠,数字的记法和处理方法必须符合规定,图和表格要合乎规范要求。例如,遗传学实验报告中染色体图的绘制必须反映显微镜下的真实情况,描绘时要用点、线结构,不许涂抹,不必加上彩色。总之,这些基本事实如有错误,会使整个实验报告失去价值。

6) 讨论:讨论不是实验结果的重述,而是以结果为基础的逻辑推论。讨论可包括:影响实验的因素有哪些?是什么?实验中观察到哪些现象,如何解释?实验中证实了那些规律?将实验结果与由已知理论推算出的预期结果进行对比,找出理论结果与实验结果的异同,并初步解释这种异同。有时,可以在“目的和要求”部分对实验提出问题,然后看“讨论”中能对问题回答到什么程度。如果认为没有必要进行讨论,这部分也可以不写。

7) 结论:结论应当简洁而中肯。可以逐条列出实验结果,可以引用关键性数据,但一般不应再列图和表格。

8) 其他:实验报告中一般没有参考文献、致谢及摘要,而在学术论文中通常是有。参考文献是指引用的别人的文章,应按作者姓名、题目、出处、出版单位、出版日期、页码的顺序写好列在文章末尾。“摘要”是写在题目下面的一段文字,内容仅包括全篇报告最突出的几条结论,并不加任何说明。“致谢”常常放在结论的文末,向给本实验或本论文提供过帮助的人或单位致以感谢。

(刘林德)

## 附录 2 实验室一般溶液的配制

### 1. 各种百分比浓度的酒精和酸的配制

所需浓度  $\%$   $= V_1 + V_2$

$$V_1(\text{原液需要量}) = \text{稀释后浓度} \times 100$$

$$V_2(\text{加水量}) = (\text{原液浓度} - \text{稀释后浓度}) \times 100$$

例：用 95% 乙醇配制 70% 乙醇。

取 95% 乙醇 70 ml (即  $V_1 = 70\% \times 100$ )，加蒸馏水至 95 ml，即得 70% 乙醇。各种百分比浓度的酸的配制方法同上，配制时应注意将浓酸漫漫加入水中。

### 2. 用固体配制百分比浓度溶液

#### (1) 体积百分比浓度

100 ml 溶液中含有固体质量的克数为固体的体积百分比浓度。

例：配制 1% 秋水仙素。

称取 1 g 秋水仙素，加蒸馏水至 100 ml 即可。

#### (2) 质量百分比浓度溶液

100 g 溶液中含有溶质的克数叫做质量百分比浓度。

即：质量百分比浓度 = 溶质质量(g) / 溶质质量(g) + 溶剂质量(g)  $\times 100\%$

$$\text{溶质质量} = \text{溶液质量百分比浓度} \times \text{溶液质量}$$

$$\text{溶剂质量} = \text{溶液质量} - \text{溶质质量}$$

### 3. 摩尔浓度溶液的配制

1 L 溶液中含有溶质的摩尔数(克分子数)称为摩尔浓度，即：

$$\text{摩尔浓度 mol/L} = \text{溶质的量(摩尔数)} / \text{溶液的体积(L)}$$

#### (1) 用固体配制

$$\text{所需固体的质量(g)} = \text{mol/L} \times V \times m$$

式中，mol/L 为溶液的摩尔浓度，V 为溶液的体积，m 为固体的摩尔质量(固体的分子质量)。

例：配制 0.02 mol/L 8-羟基喹啉溶液 100 ml。

取 8-羟基喹啉质量  $0.02 \times (100 \div 1000) \times 145.16 = 0.2903(\text{g})$  用水溶解后，加水定容，至 100 ml。



## (2) 用液体配制

$$\text{所需液体的质量(g)} = \text{mol/L } Vm/P$$

$$\text{所需液体的体积} = \text{mol/L } Vm/Pd$$

式中, mol/L 为所要配制的溶液的摩尔浓度,  $V$  为所要配制的溶液的体积 (L),  $m$  为液体试剂中溶质的摩尔浓度 (相对分子质量),  $P$  为液体试剂的质量百分比浓度,  $d$  为液体试剂的比重 (g/ml)。

例: 用 95% 浓硫酸 ( $d=1.83$  g/ml) 配制 2 mol/L 硫酸 250 ml (硫酸摩尔质量为 98)。

称取浓硫酸的质量 =  $2 \times (250 \div 1000) \times 98/95\% = 51.58$  (g)

量取浓硫酸的量 =  $2 \times (250 \div 1000) \times 98/95\% \times 1.83 = 28.2$  (ml)

将浓硫酸在不断搅拌下缓慢倒入适量水中, 冷却后再用水稀释至 250 ml 即得 2 mol/L 硫酸溶液。

## 4. 实验常用试剂的配制

## (1) 1 mol/L HCl 和 3.5 mol/L HCl

取比重为 1.19 g/ml 的浓盐酸 82.5 ml, 加蒸馏水定容, 至 1000 ml。

取比重为 1.19 g/ml 的浓盐酸 288.8 ml, 加蒸馏水定容, 至 1000 ml。

## (2) 0.4% KCl 和 0.075 mol/L KCl

称取 4 g KCl, 溶于蒸馏水中, 定容, 至 1000 ml。

称取 11.18 g KCl, 定容于 1000 ml 重蒸水中, 得到 1.5 mol/L KCl 原液。用前稀释 20 倍, 即, 量取原液, 加重蒸水至 100 ml, 即得 0.075 mol/L KCl。

(3) 5% NaHCO<sub>3</sub>

称取 5 g NaHCO<sub>3</sub>, 加重蒸水至 100 ml。

## (4) 0.85% 生理盐水

称取 0.85 g NaCl, 加重蒸水至 100 ml。

## (5) 45% 醋酸

量取 45 ml 冰醋酸, 加蒸馏水定容, 至 100 ml。

## (6) 秋水仙素溶液

称取 1 g 秋水仙素粉末, 溶于少量无水乙醇中, 加蒸馏水定容至 100 ml, 配成 1% 秋水仙素母液。各种浓度的秋水仙素液分别用母液加蒸馏水稀释即可。

## (7) 漂洗液

量取 200 ml 蒸馏水于试剂瓶中, 加入 100 ml 1 mol/L HCl 和 1 g 偏重亚硫酸钠(钾)。此液应临时配用, 溶液失去 SO<sub>2</sub> 味即不能使用。

## (8) 1/15 mol/L 磷酸缓冲液

A: 1/15 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 称取 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.078 g, 加重蒸水, 定容, 至 1000 ml。

B: 1/15 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  11.876 g 或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  23.86 g,加重蒸水定容,至 1 000 ml。

pH 7.4 的 1/15 mol/L 磷酸缓冲液: 取 A 液 18.2 ml; B 液 81.8 ml,混合后即可。

各种 pH 的 1/15 mol/L 磷酸缓冲液的配制如下表。

pH 值	1/15 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /ml	1/15 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ml	pH 值	1/15 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /ml	1/15 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ml
4.94	9.90	0.10	6.89	4.00	6.00
5.29	9.75	0.25	7.17	3.00	7.00
5.59	9.50	0.50	7.38	2.00	8.00
5.91	9.00	1.00	7.73	1.00	9.00
6.24	8.00	2.00	8.04	0.50	9.50
6.47	7.00	3.00	8.34	0.25	9.75
6.64	6.00	4.00	8.67	0.10	9.90
6.81	5.00	5.00	9.18	0.00	10.00

#### (9) 0.2 mol/L 磷酸缓冲液

A: 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  36.61 g,或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.64 g,加重蒸水定容至 1 000 ml。

B: 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6 g,或  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  31.21 g,加重蒸水定容至 1 000 ml。

0.2 mol/L 磷酸缓冲液(各种 pH)配方如下表。

pH 值	0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ml	0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /ml	pH 值	0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ml	0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /ml
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.2
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.0	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.5	5.3

#### (10) 2×SSC 溶液

0.3 mol/L NaCl 和 0.03 mol/L 柠檬酸钠: 称取 17.54 g NaCl 和 8.82 g 柠檬酸钠,用重蒸水溶解后定容,至 1 000 ml。

#### (11) BrdU 溶液

称取 BrdU 2 mg,在无菌条件下,装入无菌青霉素药瓶中,加入无菌生理盐水,用黑纸包好避光于 4℃ 冰箱中保存。现用现配。

500  $\mu\text{mol/L}$  BrdU 溶液: 取 BrdU 15.4 mg,加重蒸水 100 ml,装入棕色瓶中,包黑纸避光,4℃ 冰箱中保存。

附录 3 组织和细胞培养常用的培养基

1. 常用激素性质及其配制方法

名 称	化 学 式	相对分子质量	溶 解 特 性	配 制 方 法
吲哚乙酸 IAA	$C_{10}H_9NO_2$	175.19	易溶于热水、乙醇、乙醚、丙酮	先溶于少量 95%乙醇
吲哚丁酸 IBA	$C_{12}H_{13}NO_2$	203.24	溶于醇、丙酮、醚	同 IAA
萘乙酸 NAA	$C_{12}H_{10}NO_2$	186.20	易溶于热水,溶于丙酮、醚、苯	用热水溶解
2,4-二氯苯氧 乙酸 2,4-D	$C_8H_6ClO_3$	221.04	溶于醇、丙酮、乙醚,难溶于水	先溶于少量 95%乙醇
6-苄氨基 嘌呤 BA	$C_{12}H_{11}N_5$	225.25	溶于稀酸、稀碱,不溶于乙醇	先溶于少量 1 mol/L HCl
6-糠基氨 基嘌呤 KT	$C_{10}H_9N_5O$	215.21	易溶于稀酸、稀碱	同 BA
玉米素 (Zeatin)ZT	$C_{10}H_{13}N_5O$	219.0	同 KT	同 BA
脱落酸 ABA	$C_{15}H_{20}O_4$	264.31	易溶于碱性溶液、氯仿、乙醇	先溶于少量 1 mol/L NaOH

2. MS<sub>0</sub> 培养母液成分表

母 液	成 分	称 量/g	浓 缩 倍 数	配 制 体 积
I	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.500	20×	500 ml
	KNO <sub>3</sub>	19.000		
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.700		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.700		
	KI	0.083		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.620		
	MnSO <sub>4</sub> · 1H <sub>2</sub> O	1.690		
II	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.860	100×	500 ml
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25 mg/ml 母液 5 ml		
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25 mg/ml 母液 5 ml		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0125		
III	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.390	100×	500 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1.865		



(续 表)

母 液	成 分	称 量/g	浓 缩 倍 数	配制体积/ml
IV	肌醇 Inositol	1.00		
	烟酸 Nicotinic acid	5 mg/ml 母液 1 ml		
	维生素 B <sub>6</sub> Pyridoxine HCl	5 mg/ml 母液 1 ml	20×	500
	维生素 B <sub>1</sub> Thiamine HCl	4 mg/ml 母液 1 ml		
	甘氨酸(氨基乙酸)Glycine	20 mg/ml 母液 1 ml		
V	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	22.000	100×	500
	或 CaCl <sub>2</sub>	16.6	100×	500

3. MS<sub>0</sub> 培养母液成分表

	500 ml	1 000 ml	1 500 ml	2 000 ml
母液 I	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml
母液 II	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
母液 III	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
母液 IV	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml
母液 V	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
蔗糖 Sucrose	15.0 g	30.0 g	45.0 g	60.0 g
琼脂 Agar	3.5 g	7.0 g	10.5 g	14.0 g
pH			5.7	

4. B5 培养基的成分 (pH 5.5)

(1) 大量元素(mg/L)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> · EDTA	KNO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
134	150	27.8	37.3	2 500	370.0	150

(2) 微量元素(mg/L)

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	KI
0.025	10	2	3	0.025	0.25	0.75

(3) 维生素(mg/L)

烟 酸	VB <sub>6</sub>	肌 醇	VB <sub>1</sub>
1.0	1.0	100	10.0

(4) 有机成分(g/L)

蔗 糖	20.0	琼 脂	6.0
-----	------	-----	-----

5. H 培养基(Bourgin 和 Nitsch 1967)

化 合 物	mg/L	化 合 物	mg/L
KNO <sub>3</sub>	950	肌醇	100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720	烟酸	5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	甘氨酸	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	盐酸硫胺素	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	166	盐酸吡多素	0.5
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	25	叶酸	0.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	生物素	0.05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	蔗糖	20 000
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	琼脂	8 000
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	PH	5.5

铁盐     7.45 g Na<sub>2</sub>EDTA(乙二胺四乙酸二钠)和 5.57 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 溶解于 1 L 水,每 L 培养基取此液 5 ml。

6. LB 培养基成分表

	500 ml	1 000 ml	1 500 ml	2 000 ml
NaCl	5 g	10 g	15 g	20 g
酵母提取物 Yeast Extract	2.5 g	5 g	7.5 g	10 g
酪蛋白水解物 Tryptone	5 g	10 g	15 g	20 g
琼脂粉 Agar	7.5 g	15 g	22.5 g	30 g
pH	5 mol/L NaOH 调至 7.0~7.2			

7. YEB 培养基成分表\*

	500 ml	1 000 ml	1 500 ml	2 000 ml
酵母提取物 Yeast Extract	2.5 g	5 g	7.5 g	10 g
酪蛋白水解物 Tryptone	0.5 g	1 g	1.5 g	2 g
牛肉浸膏	2.5 g	5 g	7.5 g	10 g
蔗糖 Sucrose	2.5 g	5 g	7.5 g	10 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.247 g	0.493 g	0.740 g	0.986 g
琼脂粉 Agar	7.5 g	15 g	22.5 g	30 g
pH	5 mol/L NaOH 调至 7.4			

\* YEB 培养基不作为常备品,需要时提前 1 d 配制。

## 附录 4 常用染色液的配制

### 1. 醋酸大丽紫

取 30 ml 冰醋酸,加入 70 ml 蒸馏水,加热至沸,加入 0.75 g 大丽紫,搅动,冷却过滤,贮存于棕色瓶中。

### 2. 醋酸洋红

取 45 ml 冰醋酸,加入 55 ml 蒸馏水,加热至沸,移走火源,徐徐加入 2 g 洋红粉末,再加热至沸 1~2 min,冷却后加入 2% 硫酸亚铁(铁明矾),过滤后贮存于棕色瓶中。

### 3. 醋酸地衣红

配法同醋酸洋红,但不必加铁明矾( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。

### 4. 丙酸-乳酸-地衣红

取丙酸和乳酸各 50 ml,混合后加热至沸,加入 2 g 地衣红,冷却过滤即为原液,用时稀释为 45% 的染液。

### 5. 醋酸-铁矾-苏木精

#### (1) 配方 I

A 液: 称取苏木精 1 g,加 50% 冰醋酸或丙酸 100 ml。

B 液: 称取铁矾 0.5 g,加 50% 醋酸或丙酸 100 ml。

以上两液可长期保存,用前等量混合,每 100 ml 混合液中加入 4 g 水合三氯乙醛,充分溶解,摇匀,存放 1 d 后使用。该混合液只能存放一个月,两周内使用效果最好,故不宜多配。

#### (2) 配方 II

A 液: 称取铵明矾 $[\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$  0.1 g、铬明矾 $[\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$  0.1 g、碘 0.1 g,加 3 ml 95% 乙醇。

B 液: 浓盐酸(比重 1.19) 3 ml。

C 液: 称苏木精 2 g,加入 50 ml 45% 冰醋酸,待苏木精完全溶解后,加入 0.5 g 铁明矾( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。存放 1 d 后方可使用,染色力可保持 4 周,一次不要多配。

以上三种溶液染色时混合使用。

#### (3) 配方 III

称苏木精 0.5 g,溶解于 100 ml 45% 冰醋酸中,用前取 3~5 ml,用 45% 冰醋酸稀释 1~2 倍,加入铁明矾饱和溶液(铁明矾溶于 45% 冰醋酸中) 1~2 滴,溶液即由棕黄变为紫色,立即使用,不能保存。



## 6. 铁明矾-苏木精

A液：称苏木精 0.5 g，溶解于 100 ml 蒸馏水中（也可配成 2% 苏木精母液，用时稀释）。经 1~2 个月后方可使用，如果急用可在溶液中加入 0.1 g 碘酸钠，溶解后即可使用。

B液：称 4 g 铁明矾，溶于 100 ml 蒸馏水中，现用现配。

以上两种溶液染色前配合使用。

## 7. 席夫试剂及漂洗液

### (1) 席夫试剂

将 100 ml 蒸馏水加热至沸，移去火源，加入 0.5 g 碱性品红，再继续煮沸 5 min，并随时搅拌，冷却到 50℃ 时过滤，置入棕色瓶中，加 10 ml 1 mol/L 盐酸，待冷至 25℃ 时加入 1 g 偏重亚硫酸钠（钾），同时震荡一下，盖紧，放暗处过夜，次日取出呈淡黄色，加 0.5 g 中性活性炭，剧烈震荡 1 min，过滤后即可。如果次日取出为无色透明液体，可直接使用，不必加活性炭。

此液必须保存在冰箱中或阴凉处，并且外包黑纸，以防长期露在空气中加速氧化而变色。如不变色可继续使用，如变为淡红色可再加少许偏重亚硫酸钠，转为无色可使用，出现白色沉淀不可再使用。

### (2) 漂洗液

量取 5 ml 1 mol/L 盐酸、5 ml 10% 偏重亚硫酸钠（钾）、100 ml 蒸馏水。现用现配。

## 8. 改良苯酚（卡宝）品红染液

(1) 母液 A：100 ml 70% 乙醇加 3 g 碱性品红（可长期保存）。

(2) 母液 B：取 5% 苯酚水溶液 90 ml，加入 10 ml 母液 A（此液限于两周内使用）。

(3) 苯酚（卡宝）品红染液：取 45 ml 母液 B，加入 6 ml 37% 的甲醛。

(4) 改良苯酚（卡宝）品红：取 2~10 ml 苯酚（卡宝）染液，加 90~98 ml 45% 醋酸和 1.8 g 山梨醇，在室温下保存 2 周后再使用。

# 附录 5 实验常用数据

## 1. 主要作物种子的发芽温度和水分

名 称	发芽温度/℃			种子发芽需要水分 (相当于种子重的%)
	最 低	最 适	最 高	
水 稻	10~12	28~32	40~44	25~30
小 麦	1~2	15~20	30~35	50~55
大 麦	3~4	20~25	28~30	48~68
玉 米	6~7	28~35	44~50	40 左右
高 粱	6~7	32~33	44~50	45~50

(续 表)

名 称	发芽温度/℃			种子发芽需要水分 (相当于种子重的%)
	最 低	最 适	最 高	
谷 子	7~8	24 左右	30	25~30
大 豆	6~7	25~31	39~40	120~140
蚕 豆	3.8	25	30~35	110~120
豌 豆	1~2	25~26	36~37	100~110
棉 花	10~11	25~30	40	50 以上
大 麻	1~3	35~40	40~45	45 左右
蓖 麻	10	15~20	—	—
麻	4~6	15~20	—	—
油 菜	1~5	20~25	37~44	40~50
花 生	12	18~25	35	—
向日葵	4~6	15~20	—	55~60
芝 麻	15	24~32	—	—
甜 菜	2~3	15~20	—	100~170
烟 草	10	25~28	30~40	—
甘 薯	20	28~32	35	—
马铃薯	4~5	11~13	—	—
苜 蓿	0~5	31~37	37~44	—

2. 多种植物种子的寿命

(1) 作物种子的寿命与利用年限

名 称	寿 命/年	利用年限/年	名 称	寿 命/年	利用年限/年
水 稻	3	2	大 豆	3	2
小 麦	2	2	豌 豆	4	2
大 麦	2	2	向日葵	3	1
玉 米	3	3	南 瓜	5	4
谷 子	5	1	大 麻	3	2
高 粱	2	2			

(2) 常见花卉种子寿命

名 称	寿 命/年	名 称	寿 命/年
蜀 葵	3~4	金盏花	3~4
金鱼草	3~4	风铃草	3
耧斗菜	2	美人蕉	3~4
雏 菊	2~3	长春花	2
翠 菊	2	飞燕草	1

(续 表)

名 称	寿 命/年	名 称	寿 命/年
石 竹	3~5	福禄考	1
毛地黄	2~3	半支莲	3~4
一点纓	2~3	菊 花	3
天人菊	2	报 春	2~5
霞 草	5	牵 牛	3
向日葵	3~4	鸢 尾	2
麦秆菊	2~3	香豌豆	2
凤仙花	5~8	百 合	2
鸡 冠	4~5	剪秋罗	3~4
矢车菊	2~3	千屈菜	2
桂竹香	5	茼 蒿	4~5
醉蝶花	2~3	一串红	1~4
波斯菊	3~4	万寿菊	4
蛇目菊	3~4	旱金莲	2
大丽花	5	美女樱	2
紫罗兰	4	三色堇	2
矮牵牛	3~5	百日草	3

## 3. 几种动植物及人细胞有丝分裂持续时间

名 称	组 织	温度/℃	持续时间/min				
			前 期	中 期	后 期	末 期	总 和
洋 葱	根尖	20	71	6.5	2.4	3.8	83.7
燕 麦	根尖	19	36~45	7~10	15~20	20~35	78~110
豌 豆	内胚乳	—	40	20	12	110	182
	根尖	—	78	14.4	4.2	13.2	109.8
鸭跖草	雄蕊毛	103	103	14	6	15	128
鸢 尾	胚乳	—	40~65	10~30	12~22	40~75	102~108
	根尖	20	78	14.4	4.2	13.2	110
蚕 豆	根尖	19	90	31	34	34	199
蝗 虫	成神经细胞	—	102	13	9	57	181
蝶 蛭	胚胎肾脏细胞	20	59	55	6	75	195
	肝脏成纤维细胞	26	≥18	17~38	14~26	28	—
鸟	成纤维细胞培养物	—	102	13	9	57	181
小 鼠	脾间质细胞	38	21	13	5	20	59
人	癌细胞	37	<30	36	4	19	—



# 4. 几种植物减数分裂的持续时间

单位: 分

植 物	细线-粗线	粗线-二分体	二分体-终变期	合 计
大 麦	29.8	7.4	2.2	39.4
小 麦	16.0	5.6	2.4	24.0
黑 麦	39.4	8.1	3.7	51.2
小黑麦	12.8	5.8	2.3	20.9
百 合	120.0	24.0	24.0	168.0
延龄草	190.0	64.0	24.0	274.0

# 5. 多种生物体细胞染色体数目

名 称	染色体数目/个	名 称	染色体数目/个
衣 藻	16(n)	芥菜型油菜	36
水 绵	24	甘蓝型油菜	38
链 孢 霉	7(n)	白 菜	20
青 霉	4(n)	韭 菜	32
曲 霉	8(n)	蒜	16
玉 米	20	丝 瓜	26
大 麦	14	冬 瓜	24
小 麦	42	莴 苣	18
黑 麦	14	杨 树	38
燕 麦	42	榆	28
荞 麦	16	银 杏	24
水 稻	24	梅	16
高粱	20	杏	16
粟	18	冬 果	34
黍 铃	36	葡 萄	38,40,76
马 铃 薯	48	椰 子	32
甘 薯	90	柚 子	18
甜 菜	18	柠 檬	18,36
烟 草	48	香 蕉	22,33,44
大 豆	40	紫 花 苜 蓿	32
花 生	40	紫 云 英	16
油 桐	22	金 鱼 草	16
大 麻	20	牡 丹	20
红 苕 麻	36	麻 黄	28
萱 麻	28	板 栗	24
亚 麻	30,32	柏	22
蓖 麻	20	杉	22
芝 麻	52	垂 柳	76
圆果种黄麻	14	国 槐	28
长果种黄麻	14	刺 槐	20
白菜型油菜	20	紫 穗 槐	40

(续 表)

名 称	染色体数目/个	名 称	染色体数目/个
眼 虫	90	甘 蓝	18
水 螅	12	菠 菜	12
马 蛔 虫	4	百 合	24
蚯 蚓	32	姜 芋	22
家 蚕	56		28
海 胆	36	西 瓜	22
剑 水 蚤	4	甜 瓜	24
河 虾	116	黄 瓜	14
家 蝇	12	南 瓜	40
果 蝇	8	苹 果	34, 51
蚊 子	6	甜 橙	18, 36
海 鞘	28	桃	16
文 昌 鱼	24	李	16
泥 鳅	12	葱	16
鲤	104	胡 芦	22
鲫	94	西 胡 芦	40
非 洲 鲫 鱼	44	苦 瓜	22
牦 牛	60	倭 瓜	24
犏 牛	60	柳 树	38
云 南 野 牛	56	槐	20
山 羊	60	樱 桃	32
绵 羊	54	柿	90
亚 洲 棉	26	狗 鱼	18
非 洲 棉	26	大 麻 哈 鱼	74
海 岛 棉	52	鳙 鲢	48
陆 地 棉	52		48
向 日 葵	34	草 鱼	48
茶	30	阔 尾 鲢 鱼	48
橡 胶 豆	36	剑 尾 鱼	48
蚕 豆	12	普 通 白 鲢	80
豌 豆	14	河 鲢	24
菜 豆	22	虹 鳟	60
绿 豆	22	普 通 鲢	60
四 季 豆	22	褐 鲢	80
豇 豆	22, 24	茴 鱼	102
洋 葱	16	团 头 鲂	52
萝 卜	18	蝶 蛱 蝶	24
胡 萝 卜	18	黑 斑 蛙	26
茄 子	24	金 线 蛙	26
辣 茄	24	中 华 大 蟾 蜍	22
番 茄	24	鳄	32
芹 菜	22	蛇	36

(续 表)

名 称	染色体数目/个	名 称	染色体数目/个
鸡	78	猫	38
火鸡	82	黄 牛	60
鸭	80、78	水 牛	48
鸽	80	瘤 牛	60
袋 鼠	20	驴	62
豚 鼠	64	马	64
金地鼠	44	猪	38
大 鼠	42	鹿	14
小 鼠	40	猕 猴	42
兔	44	人	46
狗	78		

6.  $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$  值分布表

自由度	概 率 值(P)				
	0.99	0.95	0.05	0.01	0.001
1	0.000 157	0.003 93	3.841	6.635	10.83
2	0.020 1	0.103	5.991	9.210	13.82
3	0.115	0.352	7.815	11.34	16.24
4	0.297	0.711	9.488	13.28	18.47
5	0.554	1.145	11.07	15.09	20.51
6	0.872	1.635	12.59	16.81	22.46
7	1.239	2.167	14.07	18.48	24.32
8	1.646	2.733	15.51	20.09	26.13
9	2.088	3.325	16.92	21.67	27.88
10	2.558	3.940	18.31	23.21	29.59
11	3.053	4.575	19.68	24.72	31.26
12	3.571	5.226	21.03	26.22	32.91
13	4.107	5.892	22.36	27.69	34.53
14	4.660	6.571	23.68	29.14	36.12
15	5.229	7.261	25.00	30.58	37.70
16	5.812	7.962	26.30	32.00	39.25
17	6.408	8.672	27.59	33.41	40.79
18	7.015	9.390	28.87	34.81	42.31
19	7.633	10.12	30.14	36.19	43.82
20	8.260	10.85	31.41	37.57	45.31
21	8.897	11.59	32.67	38.93	46.80
22	9.542	12.34	33.92	40.29	48.27
23	10.20	13.09	35.17	41.64	49.73
24	10.86	13.85	36.42	42.98	51.18



(续 表)

自由度	概 率 值( $p$ )				
	0.99	0.95	0.05	0.01	0.001
25	11.52	14.61	37.65	44.31	52.62
26	12.20	25.38	38.89	45.64	54.05
27	12.88	16.15	40.11	46.96	55.48
28	13.56	16.93	41.36	48.28	56.89
29	14.26	17.71	42.56	49.59	58.30
30	14.65	18.49	43.77	50.89	59.70

注: 本表可用于频数分析和差异显著性检验。表中的数值,除自由度与概率值外均为  $\chi^2$  值。

### 7. $t$ 值分布表\*

自由度	概 率 值(P)					
	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	6.314	12.71	31.82	63.66	318.3	636.6
2	2.920	4.303	6.965	9.925	22.33	31.60
3	2.353	3.182	4.541	5.841	10.21	12.92
4	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	2.015	2.572	3.365	4.032	5.893	6.869
6	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.767
24	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707

(续 表)

自由度	概 率 值(P)					
	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
27	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646

\* 本表用于差异显著性及可信限测定,由计算所得  $t$  值根据其自由度可查得概率值。例如,自由度为 10,  $t$  值为 3.169 时,其概率值为 0.01,即 1%。反之,也可根据自由度和所需概率值,查得  $t$  值。

## 附录 6 消毒及灭菌

### 1. 玻璃器皿的灭菌

玻璃器皿清洗晾干后,用报纸或牛皮纸包好,以免灭菌后被重新污染。

#### (1) 湿热灭菌

用高压蒸气锅灭菌,灭菌时先放出冷空气,至放气阀喷出蒸气时再升压,一般用 0.105 MPa 20 min 即可。灭菌完毕后排放蒸气,取出后烘干备用。

#### (2) 干热灭菌

有橡皮头的玻璃器具不能使用干热灭菌。

将包好的器皿均匀地放入干燥箱内,注意用纸包扎的物品不要靠近干燥箱壁,不要摆得太挤,以免影响气体流通。干燥箱温度调至 160℃,在 160~170℃ 恒温下处理 2 h 即可。灭菌后到干燥箱冷却至 40~50℃ 时方可开门取物。

### 2. 金属器械的灭菌

接种针、接种环可直接在火焰上灼烧灭菌。

解剖器具一般用煮沸法消毒,煮沸 15~30 min 即可杀死细菌营养体,而对其芽孢则需 1~2 h。在水中加入 2% 碳酸钠可促使芽孢死亡,亦可防止金属器械生锈。

金属器具(除刀具外)也可用于热灭菌和湿热灭菌。也可用 5% 石炭酸或 1:50 的新洁尔灭浸泡灭菌。

### 3. 无菌室、接种箱的灭菌

#### (1) 加热蒸馏

按熏蒸空间 2~6 ml/m<sup>3</sup> 计算,量取 36%~40% 甲醛溶液,盛于小铁桶内,用三脚架支好,在酒精灯内注入适量酒精(估计能蒸干甲醛溶液所需的量,不要超过太多)。将室内各物品准备妥当后点燃酒精灯,关闭室内,任甲醛溶液煮沸挥发。熏蒸 12 h 以上。

## (2) 氧化熏蒸

称取高锰酸钾为 1/2 甲醛的用量,于瓷碗或玻璃容器内,再取定量的甲醛溶液,室内准备妥当后,把甲醛倒入盛有高锰酸钾的器皿内,立即关门,几秒钟后甲醛溶液即沸腾蒸发。关门熏蒸 12 h 以上。

甲醛对人的眼、鼻有强烈刺激,为减弱甲醛对人的刺激,熏蒸 12 h 以后,取与甲醛等量的氨水迅速放入室内,同时敞开门窗放出剩余有刺激性的气体。

## (3) 喷刷消毒

用 3%~5% 石炭酸或 1%~5% 漂白粉在室内喷刷墙面、地面。

## (4) 紫外线灭菌

2560~2260 Å 波长的紫外线杀菌力最强。其机制是诱导形成胸腺嘧啶二聚体,抑制 DNA 复制和使空气中产生臭氧( $O_3$ )杀菌。紫外线透过物质的能力很差,只用于空气及物体表面的灭菌。常在熏蒸和喷刷灭菌后,操作前半小时进行。通常紫外线的照射时间为 20~30 min。

紫外线由紫外线灯管产生,对人体也有伤害作用,不能直视开着的紫外灯,更不能在开着紫外灯的情况下工作,可见光能激活生物体中的光复活酶,使形成的胸腺嘧啶二聚体拆开复原,因此,不能在开紫外灯的同时开日光灯或钨丝灯。

## 4. 培养基和药剂的灭菌

一般培养基在 0.105 MPa 下灭菌 20 min;溶液类(如盐溶液、EDTA 溶液等),应用 0.056 MPa 灭菌 30 min 或 0.07 MPa 10 min;葡萄糖、氨基酸、生物素等用 0.056 MPa 灭菌 20 min;组织培养中常用的生物活性物质(如酶溶液、培养基、血清等)不能用高温、高压法灭菌,应该用过滤除菌法处理。常用的除菌滤器有以下几种。

### (1) 蔡氏滤器(Seitz 滤器,又称赛氏滤器)

是用金属制成的滤器,用后洗净,干后高压灭菌。滤板为石棉制成,每次换用新的滤板,安装时光面向下。滤板型号有多种,国产的一般分为甲 1、甲 2、甲 3 型,相当于进口 EK 型除菌滤板的 EK、EK<sub>s</sub>、EK<sub>s1</sub> 型。石棉滤板往往使滤液中有微量毒素,对细胞生长不利,因此,使用前要用无菌生理盐水洗 3~5 次。胰酶通过石棉滤板会失去活性,pH 值也会升高,所以最好不用。近年来常用各种型号的醋酸纤维薄膜放入蒸馏水中,灭菌后再用。

### (2) 玻璃滤器

玻璃滤器的滤板是用玻璃粉热压制成的,滤板与玻璃漏斗黏合在一起。常用滤菌型号为 G<sub>5</sub>、G<sub>6</sub>。新滤器表面有碱性物质,应先在流水中彻底洗涤,然后放入 1:100 的盐酸中浸泡数小时,再用流水洗涤;用过的滤器 0.070 MPa 高压灭菌 1 h,冷却后取出,烘干即可。由于玻璃滤器高压灭菌后会在板上析出碱性物质,使用前可先用水或少量滤液洗涤。

玻璃滤器不能用含有重铬酸钾的洗液浸泡,因为可能影响玻璃孔的电荷,用于



洗涤玻璃滤器的洗液为浓硫酸-硝酸钠洗涤液。

浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ (化学纯)	5.72 ml	蒸馏水	94 ml
$\text{NaNO}_3$ (化学纯)	2 g		

使用完后,立即用浓硫酸-硝酸钠洗涤液抽滤一次,滤液未干时将滤器进入洗液中(滤片两面均应接触洗液)约 48 h,取出后用热蒸馏水冲洗至中性,烘干后备用。

玻璃滤器常用真空减压法抽滤,当液体临近抽滤完毕时,应减小压力,停止抽滤,否则,液体抽完后有可能将细菌抽滤下去。

## 附录 7 玻璃器皿的洗涤

### 1. 重铬酸钾洗涤液的配制

#### (1) 浓配方

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (工业用)	60 g	自来水	300 ml
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (工业用)	460 ml		

#### (2) 稀配方

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (工业用)	60 g	自来水	1 000 ml
浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ (工业用)	60 ml		

#### (3) 配制方法

将重铬酸钾溶解于水中,然后慢慢加浓硫酸,边加边搅动,配好的溶液呈红色。将配好的洗液盛放于有塞玻璃瓶中,以防氧化变质。洗液为强氧化剂,去污力强,常用来洗去玻璃瓶或瓷质器皿上的有机物质,切不可洗涤金属器具。此液可反复使用至变蓝失效为止。

### 2. 玻璃器皿的处理

#### (1) 新购置的玻璃器皿的处理

新购置的玻璃器皿含有游离碱,先用 2%  $\text{HCl}$  或洗涤液浸数小时,再用清水洗净。

新的载玻片和盖玻片,先浸在肥皂水中,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗,晾干。或洗后用纱布擦干,浸于含 2%  $\text{HCl}$  的 90% 乙醇中保存备用,用时在酒精灯上烧去酒精即可。

#### (2) 旧载玻片和盖玻片的处理

将旧玻片放在肥皂水中煮沸 10 min,然后用毛刷去掉上面的污物,流水冲洗之后,放入洗液中浸泡数小时,将玻片从洗液中取出,然后流水冲洗 2 h 以上,再用

蒸馏水冲洗 2~3 次,最后浸入 95%乙醇或蒸馏水中保存备用。

### (3) 带油污玻璃器皿的处理

凡带有凡士林或石蜡油的玻璃皿,在未洗刷前,尽量除去油腻,然后放入 5%苏打液内煮两次,再用肥皂水和热水冲刷,最后用清水洗净。

### (4) 带菌玻璃器皿的处理

1) 带菌载玻片处理 先浸在 5%石炭酸或 1:50 的新洁尔灭溶液中消毒,然后用夹子夹出,依上法冲洗干净。

2) 带菌移液管及滴管的处理 先在 5%石炭酸或 0.25%的新洁尔灭溶液中浸泡数小时或过夜,取出后高温灭菌,然后用自来水冲洗,及蒸馏水冲洗。

3) 其他带菌玻璃器皿的处理 将器皿连同内容培养物一起放入高压灭菌器中 15 磅灭菌 20~30 min,然后趁热倒出培养物,再用肥皂热水洗刷,用自来水冲洗干净。

经以上处理的器皿可用于一般实验。进行分析类实验时,可先在洗液中浸洗数十分钟,然后用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗,用双蒸水浸洗 10 min,烘干备用。

## 附录 8 实验报告范文

### 范文一

课 程:	遗传学	系 别:	生物科学系
实验号数:	1	班 级:	××××
实验日期:	2004-06-20	姓 名:	×××
题 目:	植物细胞有丝分裂及染色体行为的观察 教师签字:		

### 植物细胞有丝分裂及染色体行为的观察

#### 一、实验目的

1. 观察植物细胞有丝分裂过程及各时期染色体的特征。
2. 学习并掌握植物染色体玻片标本的制作方法。

#### 二、实验原理

细胞分裂是细胞繁殖的惟一途径,细胞分裂一般分为直接分裂和间接分裂。直接分裂也就是无丝分裂,细胞核直接地一分为二。间接分裂又可分为有丝分裂及减数分裂两种。

植物体生长旺盛的分生组织(如根尖、茎尖、幼叶等),都在进行着有丝分裂。经过取材、固定、解离、染色和压片等处理过程,将细胞分散在装片中,在显微镜下就可看到大量处于有丝分裂各时期的细胞和染色体。由于有丝分裂中期的染色体具有典型的形态特征,并易于计数,所以为了获得更多的中期染色体图像,可以采

用药物处理或冰冻处理的方法,阻止纺锤体的形成,使细胞分裂停止在中期。同时,通过处理可使染色体缩短变粗,易于分散,便于进行观察研究。另外,通过对组织细胞进行酸性水解或酶处理,可以分解细胞之间的果胶层,并使细胞壁软化。这样,细胞容易彼此散开,有利于染色和压片。

### 三、实验材料和用品

#### 1. 材料

洋葱(*Allium cepa*)、大蒜(*Allium sativum*)的鳞茎,玉米(*Zea mays*)、黑麦(*Secale cereale*)、小麦(*Triticum aestivum*)、蚕豆(*Vicia faba*)的种子等。本实验以大蒜为实验材料。

#### 2. 用具及药品

显微镜、恒温培养箱、电冰箱、水浴锅、分析天平、1/100 天平、电热套或电炉、温度计、剪刀、镊子、刀片、解剖针、载玻片、盖玻片、滤纸、擦镜纸、量筒、量杯、漏斗、玻棒、培养皿、三角瓶、烧杯、试剂瓶、滴瓶、指管、酒精灯、火柴、切片盒、标签、铅笔、胶水、纱布等。

蒸馏水、无水乙醇、95%乙醇、二甲苯、冰醋酸、醋酸钠、苯酚、甲醛、碱性品红、山梨醇、秋水仙素或对二氯苯或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉、中性树胶(或油派胶)、卡诺氏固定液、1 mol/L 盐酸、45%醋酸、1%龙胆紫、4%铁矾水溶液、2%醋酸洋红染色液或改良苯酚品红染色液、2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶混合液。

### 四、实验步骤

#### 1. 材料准备与取材

可直接从田间挖取刚长出的幼嫩根尖,也可以在室内培养根尖。本实验用大蒜根尖作材料,因为取材方便,而且能够获得较多的根尖,可供多人使用。

首先将大蒜瓣扒去皮,然后用细铁丝串起放在盛清水的培养皿内,使根部与清水接触,在 20~25℃光照条件下培养 2~3 d,待根尖长到 1~2 cm 时,选择健壮根尖自尖端约 1 cm 处剪下准备预处理用。剪取根尖的时间以上午 10 时左右为好。

#### 2. 预处理

为了阻止纺锤体的活动,获得较多的中期分裂相,同时使染色体相对缩短,便于染色体分散和计数,可对根尖进行预处理。预处理的方法有药物和冰冻预处理两种。

##### (1) 药物处理

将材料放在培养皿中,加 0.05%~0.2%秋水仙素水溶液室温下处理 2~4 h,也可用对二氯苯饱和水溶液或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉水溶液室温下处理 3~4 h。这些药物都能使染色体缩短,但对染色体有破坏作用。使用时应注意处理的时间,小麦、黑麦、大麦、圆葱和大蒜等处理 2~4 h 为宜,棉花和水稻等处理 2 h 左



右为宜。而且处理时间长短与温度也有很大的关系。

### (2) 冰冻处理

将根尖浸泡在蒸馏水中,置于1~4℃冰箱内或盛有冰块的保温瓶中冰冻24 h。这种方法对染色体无破坏作用,染色体缩短均匀,效果良好,简便易行,各种作物都适用,但常用于处理禾本科植物材料。

如果只是为了观察有丝分裂各个时期的染色体动态变化而不进行染色体计数,可以不进行预处理。

### 3. 固定或前低渗

将经过预处理和未经预处理的材料(用于和经预处理的根尖进行对比)用蒸馏水冲洗两次,然后转移到卡诺氏固定液(3份无水乙醇,加入1份冰醋酸,现用现配)中,室温下固定3~24 h。或者将根尖放入0.075 mol/L KCl溶液中低渗处理20 min,然后再用蒸馏水冲洗2~3次。

注意:如果固定后的材料不立即使用,可放在70%酒精中,置冰箱或阴暗处保存。用时再用固定液重新固定一下(30 min~3 h)效果会较好。

### 4. 解离

常用的解离方法有以下几种。① 将根尖用蒸馏水冲洗2次,放入已经在60℃水浴锅中预热的1 mol/L盐酸中,在60℃恒温条件下处理5~10 min,当根尖的伸长区变透明而分生区呈米黄或乳白色时即可取出;② 将根尖放入2.5%纤维素酶和2.5%果胶酶的等量混合液中(pH 5.0~5.5),室温下处理3 h左右;③ 将根尖放入95%酒精和浓盐酸(1:1)混合液中处理2~10 min,或将根尖放入5 mol/L盐酸中处理5~10 min。

### 5. 染色与压片

将解离好的材料用蒸馏水冲洗以后,转入45%醋酸中软化10 min左右。取1~2根软化好的根尖放在载玻片上,用刀片切去伸长区,只留下1~2 mm的分生区,也就是生长点,滴一滴龙胆紫染色液,染色3~5 min;也可用改良苯酚品红染色液,染色10~15 min;也可用醋酸洋红染色液染色30 min左右。

染色完毕,加上盖片,在酒精灯火焰上过3~4次,以手背试之,感觉微烫为宜(如果室内气温较高,或认为染色较好,也可不用酒精灯烤片)。在盖片上复以吸水纸,用左手拇指压住盖片的一角,用右手拿铅笔垂直敲盖片几下,用力要均匀,尽量多敲几下,把材料震散。继续用左手拇指压住盖片一角,用右手拇指用力下压盖片,在保证两玻片不错动的前提下,将材料压成薄薄一层,即可放在显微镜上观察。

### 6. 镜检

压好的片子先在低倍镜下镜检,找到分裂细胞后,再转换成高倍镜观察染色体的动态变化。注意比较经过预处理和未经预处理的材料的不同之处。如果染色体

分散良好,图像清晰,就可以脱水封片,制成永久片。

### 7. 永久制片

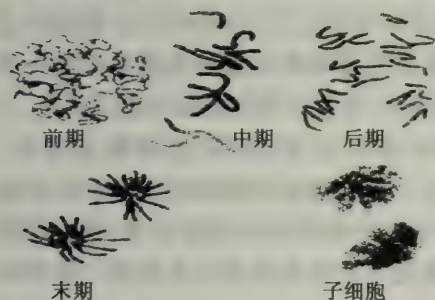
将玻片标本用干冰或制冷器冷冻数分钟,也可放在冰箱中冷冻几小时,取出后用薄刀片掀开,将附着材料的载片或盖片置于 37℃ 恒温箱中烘干,然后在二甲苯中透明 15 min 左右,中性树胶封片,干燥后即可长久保存。

## 五、实验结果

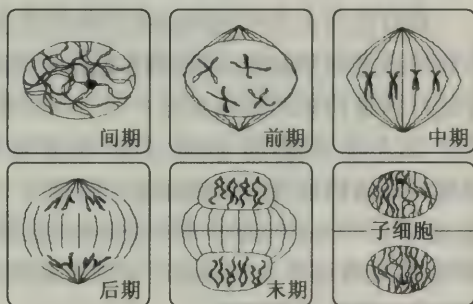
由于做实验时,严格按照教材操作规程,并且在教师的指导下,制作的植物根尖的压片也比较清晰,因此本实验结果基本验证了植物有丝分裂的现象,而且在实验过程中也找到了有丝分裂:前期、中期、后期和末期的分裂相各个时期。各个分裂时期的图形如附图 1。

## 六、作业与思考

根据实验结果,绘出在显微镜下观察到的有丝分裂各时期的图像的示意图并注明时期(附图 2)。



附图 1 有丝分裂各个分裂期的图形



附图 2 有丝分裂各个分裂期的示意图形

(周国利)

## 范文二

### 植物愈伤组织的超低温保存

刘传召

指导教师: 郭善利

(聊城师范学院生物系 山东聊城 252059)

**【摘要】** 对毛白杨、地椒、蒲公英的愈伤组织超低温保存中的一些因素进行了对比研究,试验的重点在于不同的保护剂在超低温保存中对植物组织保护的作用。

试验结果表明：在液氮( $-196^{\circ}\text{C}$ )温度下,地椒用 5%二甲基亚砷+10%甘油+6%蔗糖保护剂保存较好;毛白杨、蒲公英用 10%二甲基亚砷+0.5 mol/L 甘露醇保存较好。

**【关键词】** 愈伤组织 超低温保存 毛白杨 地椒 蒲公英

植物组织培养可以迅速建立无菌植物无性繁殖系,是种质保存的有效途径之一。随着组织培养技术的完善,发现用组织培养维持种系的缺点在于继代培养的费用,和因误差或微生物污染造成的危险,更重要的是在继代培养过程中发生细胞学变化导致染色体变异和基因突变,以及形态建成能力的丧失<sup>[1~3]</sup>。超低温通常是指低于 $-80^{\circ}\text{C}$ 的低温,主要是液氮以及液氮蒸气相,在超低温下活细胞的物质代谢和生长活动几乎完全停止,植物材料处于相对稳定的状态。因而对植物愈伤组织的保存超低温冷冻是较为理想的途径。它不仅可以解决组织细胞继代培养中的变异问题,还可以用于长期保存无性系繁殖植物的优良品种,以及育种工作中要求的纯系,避免自然界累积性突变,建立去病毒茎尖分生组织以及稀有和濒危动物物种资源的储存同时也便于国际交流<sup>[1,2,4,5]</sup>。

到目前为止通过超低温保存获得成功的植物材料已达百余种<sup>[6,7]</sup>。我国在这方面的研究起步较晚,对植物愈伤组织超低温保存成功的首篇报道是来自简令成等的甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究,在此以后又陆续出现了玉米、三分三、红豆草、唐菖蒲、杜仲、野生稻、凹叶厚朴、香雪兰、杏、银杏、猕猴桃、红豆杉、光棘豆等植物愈伤组织保存成功的报道<sup>[3,8~17]</sup>。植物愈伤组织保存技术正日趋成熟,从目前研究的成果来看,该技术的关键在于材料培养、冰冻保护处理、冰冻降温程序、解冻再培养几个方面。而冰冻保护剂处理是尤为重要的一个环节。本试验仅就这个环节进行探讨。

## 1. 材料与方法

### 1.1 材料培养

在材料培养过程中用到的培养基有以下几种:

- a.  $\text{MBD}_2$ :  $\text{MS} + \text{B}_5$  有机酸 + 2,4-D 2 mg/L
- b.  $\text{MSB}_2$ :  $\text{MS} + 6$  - BA 2 mg/L
- c.  $\text{MSI}_{0.5}\text{B}_1$ :  $\text{MS} + \text{IAA} 0.5 \text{ mg/L} + 6$  - BA 1 mg/L
- d.  $\text{MSI}_{0.2}\text{B}_1$ :  $\text{MS} + \text{IAA} 0.2 \text{ mg/L} + 6$  - BA 1 mg/L
- e.  $\text{MSN}_{0.2}\text{B}_2$ :  $\text{MS} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg/L} + 7$  - BA 2 mg/L

以上培养基均加入酪蛋白 250 mg/L 和琼脂 8 g/L

地椒愈伤组织由无菌苗的茎段(除去节,只留节间)或叶接于 a 或 b 上诱导而来,在 c 上继代培养,生长 10~15 d 的愈伤供试。

毛白杨愈伤由毛白杨的茎尖或叶接于 a 上诱导而来,并在 a 上继代培养,生长 10~15 d 的材料供试。



蒲公英愈伤叶片接于 b 或 e 上诱导,愈伤组织在 b 或 d 上继代培养,生长 10~15 d 的材料供试。

### 1.2 冰冻保护处理

使用的冰冻保护剂为 5 种,均为复合保护剂,如下:

- (1) 10%二甲基亚砷+3%蔗糖
- (2) 10%二甲基亚砷+12%蔗糖
- (3) 10%二甲基亚砷+0.5 mol/L 甘露醇
- (4) 10%二甲基亚砷+10%甘油
- (5) 5%二甲基亚砷+10%甘油+6%蔗糖

将培养 10~15 d 的愈伤切成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的组织块,放入冻存管内,加入冰冻保护剂至没过组织块,加盖,并用封口膜封住管口,4℃保持 30 min,备用。

### 1.3 冰冻降温

由 4℃直接投入液氮和低温冰箱内。

### 1.4 解冻和洗涤

40℃水浴解冻,倾去全部保护剂,用对应的液体继代培养基冲洗 3 次。

### 1.5 存活率的检测

将解冻洗涤后的组织块称取 100 mg,置于 10 ml 试管中,然后加入 0.5% TTC(氯化三苯四氮唑)溶液 5 ml,在 20~25℃下黑暗中静置 18~20 h,倾去 TTC,蒸馏水洗涤 2~3 次,再加入 95%乙醇 5 ml,60℃水浴 20~30 min,提取 TTC 被还原生成的红色甲萘用 723 分光光度计于 485 nm 波长处测试提取液的光吸收值。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 愈伤组织培养时间的选择

细胞的抗寒能力与其分裂和生长活动等生理状态有密切关系,一些研究表明:处于快速生长的组织抗冻能力较强。毛白杨、地椒、蒲公英的愈伤组织在接到新鲜的继代培养基以后 7~20 d 内生长较快,之后细胞开始衰落。故本试验所用的愈伤组织均是在新鲜培养基上培养 10~15 d 的处于生长旺盛时期的组织。

### 2.2 冰冻保护剂

很多研究表明:单一的保护剂对细胞的伤害较大,而复合保护剂的毒性较小,这可能是因为复合保护剂中各组分产生累加效应减小或消除了单一成分的毒害作用<sup>[3,17]</sup>。各种保护剂对材料的保存效果如下。

表 1 液氮保存后各组织的 TTC 还原值及细胞活力

	地 椒		毛 白 杨		蒲 公 英	
	TTC 还原值	细胞活力/%	TTC 还原值	细胞活力/%	TTC 还原值	细胞活力/%
(1)	0.234	63.6	0.140	47.4	0.238	44.1
(2)	0.205	60.3	0.135	34.1	0.266	49.2
(3)	0.201	59.4	0.230	58.2	0.357	66.1
(4)	0.204	60.6	0.205	51.9	0.302	55.7
(5)	0.215	69.2	0.125	31.6	0.217	40.1

注：细胞活力=保存后的愈伤组织 TTC 还原值/未保存的愈伤组织 TTC 还原值。未保存的愈伤组织 TTC 还原值：地椒：0.338A；毛白杨：0.395A；蒲公英：0.540A。

结果表明：复合保护剂的保存效果是较为理想的，虽然不同的保护剂保存效果之间存在着一些差异，但差异并不显著。对三种材料而言，(5) 对于地椒、(3)对于毛白杨、(3)对于蒲公英的保存效果较好一些。而且五种保护剂对于三种材料的保存并没有规律可言，即没有一种保护剂可以使三种材料都有较高的存活率。

值得注意的一点是：使用同样的保护剂，在低温冰箱内保存的材料细胞活力则较低，均低于 10%，这说明低温冰箱虽然在动物细胞保存方面取得了较好的效果，但在植物细胞保存方面仍有不足之处。原因可能是：-87℃更易于形成冰晶，对植物细胞的伤害较大<sup>[7,11,14]</sup>。

2.3 降温冰冻

常见的降温冰冻方法有三种：① 快速冷冻法；② 逐步冷冻法；③ 慢速冷冻法。三种方法都能成功地保存材料<sup>[4]</sup>。缓慢冷冻时，由于细胞外的水分首先变成小冰晶，细胞外部溶液浓度提高，细胞内外形成渗透压梯度，使细胞脱水，同时也损伤了细胞壁；快速冷冻时，形成冰晶的速度较快，细胞不易脱水，对细胞壁的损伤也较小。该方法曾成功地保存了康乃馨的茎尖<sup>[1]</sup>。因条件限制本试验采用了快速冷冻法，亦取得了较好的效果。

2.4 融冰与再培养

保存样品的融冰速度是超低温保存中的一个重要问题，缓慢融冰，由于细胞内发生剧烈的冰晶再结晶过程，易导致细胞死亡<sup>[2]</sup>。相反 40℃水浴快速融冰则避免了这一过程的发生，细胞的存活率较高。

将融冰的组织块洗去保护剂，接于新鲜培养基上进行暗培养，再培养的时间较长，一般 10 d 之后才恢复生长，待完全恢复还需要一段较长的时间<sup>[3,6,7]</sup>。恢复培养的结果有待进一步观察。

3. 结语

试验结果表明，复合保护剂在超低温保存愈伤组织过程中，具有较好的保护作用，推动了植物愈伤组织超低温保存的研究。植物愈伤组织超低温保存的研究目

前虽已取得了一些进展,但许多问题尚有待进一步探讨。比如:对超低温保存后材料的遗传稳定性的研究;对再培养的植株缺乏结构上和细胞学上的研究;保护剂的作用机理尚不完全清楚;冻存保护技术中各因素的相互作用知之甚少;各种植物的组织在超低温保存过程中是否有共同的保存途径等等,这些问题需要做进一步的研究。

致谢:在试验过程中得到了孙震晓、张谦明老师的指导,王风亭、董平原、王世华、迟娜、苏俊伟等同学的积极帮助,再此一并表示感谢。

### 参考文献

- 1 罗士伟,唐惕. 细胞生物学杂志. 1987(1): 1~7
- 2 罗士伟,许智宏. 经济植物组织培养. 北京: 科学出版社. 1988. 227~235
- 3 钱士忠,赵树仁. 光棘豆(*Oxytropis leptophylla* DC)愈伤组织超低温冰冻保存的研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版),1995,18(2): 56~61
- 4 简令成,孙德兰,孙龙华. 甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究. 植物学报,1987,29(2): 123~131
- 5 Bajaj YPS. Cropreservation and international exchange of germplasm. In: Plant cell culture in cropimprovement Ksen CS and Giles K. L.. New York: Plenum Press 1983, 9~4
- 6 Brian W W. Genetic preservation in bitro. In: Ebans Daed Progress in plant Cellar and Molecular Biology-Proceedings of the VIIth International Congress on plant tissue and Cell Culture. Amsterdam: Elsevier Press. 1990, 13~22
- 7 Kartha KK. Cryopresservation of plant cell and organs. Boca Raton florida: CRC Press Inc. 1985
- 8 郑光植,何静波,王世林. 三分三愈伤组织及其悬浮细胞的冰冻储藏. 植物学报,1983,25(6): 512
- 9 孙龙华,简令成. 红豆草愈伤组织的超低温保存及其超微结构的观察. 植物学报,1990,32(4):262
- 10 李全顺,王洪庆. 唐菖蒲愈伤组织超低温保存的研究. 植物生理学通讯, 1989(2):48~50
- 11 李贤旺,杜琴,罗光明等. 杜仲愈伤组织培养超低温保存的研究. 生物学杂志,1996(4): 21~24
- 12 殷晓辉,舒理慧,郑从义等. 野生稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成. 武汉植物学研究,1996,14(3): 247~252
- 13 刘贤旺,杜琴. 凹叶厚朴愈伤组织的超低温保存. 植物资源与环境, 1996,5: 9~13



- 14 李国风,叶和春,董教望等. 新疆紫草愈伤组织超低温保存. 植物学报, 1992,34(2): 962~964
- 15 刘贤旺,杜琴等. 杜仲愈伤组织培养及其超低温保存. 江西中医学院学报,1997,9(2): 35~37
- 16 李嘉瑞,郭延平,王民柱. 猕猴桃愈伤组织的超低温保存. 果树科学, 1996,13(2): 88~91
- 17 徐刚标,李美娥,郑从义等. 银杏愈伤组织超低温保存的研究. 林业科学, 2001,37(3)

## The Cryopreservation of Plant Callus

×××

Instructor: ×××

**Abstract:** The experiment compares the main factors of cryopreservation of *thymus Quinques*, celak. *Taraxacum. mongoliaim*. *Hand-Mazz*. *Populus Tomentosa Carr Callus*. The stress of this experiment is the effect of defferent Cryopreserved materials on callus. The result shows that celak callus was well cryopreserved in 5% DMSO + 10% glycerine + 6% sucrose; Hand-mazz callus and Carr callus was well cryopreserved in 10% DMSO + 0.5 mol/L mannitol with LN (liquid itrogen -196°C).

**Key word:** Cryopreservation Callus Thymus Quinques. Celak. Taraxacum. mongoliaim. Hand-Mazz Populus Tomen-tosa Carr

## 参考文献

- 北京大学生物系遗传学教研室. 1983. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社
- 陈瑶生, 盛志廉. 1999. 数量遗传学. 北京: 科学出版社
- 傅焕延, 王彦亭, 王洪刚等. 1987. 遗传学实验. 北京: 北京师范大学出版社
- 河北师范大学等. 1982. 遗传学实验. 北京: 高等教育出版社
- 华卫建, 吕君. 2002. 新编人类群体遗传学实验一组. 遗传, 24(3): 432~444
- 兰泽蓬, 梁学礼. 1990. 遗传学实验原理和方法. 成都: 四川大学出版社
- 兰州大学. 2000. 细胞生物学实验. 北京: 高等教育出版社
- 兰州大学生物系细胞遗传教研室, 细胞学研究室. 1986. 细胞生物学实验. 北京: 高等教育出版社
- 李艳, 邵阳光, 孙晖. 2001. 异色瓢虫——简单而方便的遗传学实验材料. 生物学通报, 36(3): 39~40
- 李荫蓁. 1988. 细胞生物学实验. 北京: 北京大学出版社
- 梁彦生等. 1989. 遗传学实验. 北京: 北京师范大学出版社
- 刘祖洞, 江绍慧. 1987. 遗传学实验. 第2版. 北京: 高等教育出版社
- 邱奉同, 刘林德. 1992. 遗传学实验. 青岛: 青岛海洋大学出版社
- 宋邦钧, 琮宜等. 1993. 作物遗传与育种学实验实习指导. 北京: 农业出版社
- 盛祖嘉, 陈中孚. 1982. 微生物遗传学实验. 北京: 高等教育出版社
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社
- 王小艺, 沈佐锐. 2002. 异色瓢虫的应用研究概况. 昆虫知识, 39(4): 255~261
- 吴仲贤. 1997. 统计遗传学. 北京: 科学出版社
- 杨红, 熊继文, 张帆. 2003. 异色瓢虫人工饲料研究进展. 山地农业生物学报, 22(2): 169~172
- 姚敦义等. 1990. 遗传学. 青岛: 青岛出版社
- 张丽, 王艳华, 刘林德. 2004. 利用果蝇验证有效积温法则, 探讨生物与温度的关系. 生物学通报, 39(4): 53~54
- 张振宇. 细胞生物学实验. 山东师范大学生物系(内部资料)
- 浙江农业大学. 1984. 遗传学. 北京: 农业出版社
- 朱玉贤等. 2002. 现代分子生物学. 第2版. 北京: 高等教育出版社
- Falconer DS, Mackay TFC. 2000. 储明星译, 师守堃校, 数量遗传学导论. 北京: 中国农业科技出版社

收到期 2005年4月7日  
来源 科学出版社  
书价 19.00元  
单据号 20436725  
开票日期 2005年4月29日

植物学杂志

英文摘要

# The Cryopreservation of Plant Callus

Instructor, 英文摘要

Abstract: The experiment compared the cryopreservation of plant callus with

rhymis Quinques, celatid out of the callus of the plant callus was

Tomato Carr Culture. The cryopreservation of plant callus was

Cryopreserved materials on callus. The result shows that the callus was

cryopreserved in 5% DMSO + 10% glycerol. The cryopreservation of

and Carr culture. The cryopreservation of plant callus was

with LN<sub>2</sub> liquid nitrogen -196°C.

cryopreservation of plant callus was

mong-Tomato. Haha-Mong-Populus-Tomato Carr

(种名缩写) 是植物学杂志, 英文摘要, 不发表

种名缩写, 英文摘要, 不发表

种名缩写, 英文摘要, 不发表

种名缩写, 英文摘要, 不发表

中科院植物所图书馆



S0003890





责任编辑:陈 露 张 臻

封面设计:一 明

## 能力培养型 生物学基础课系列实验教材

《植物学实验教程》	赵遵田	苗明升	主编
《生态学实验教程》	付荣恕	刘林德	主编
《遗传学实验教程》	郭善利	刘林德	主编
《动物学实验教程》	孙虎山		主编
《生物化学实验教程》	刘箭		主编
《植物生理学实验教程》	侯福林		主编
《微生物学实验教程》	杨革		主编
《细胞生物学实验教程》	安利国		主编
《人体解剖生理学实验教程》	艾洪滨		主编



ISBN 7-03-014203-9



9 787030 142030 >

ISBN 7-03-014203-9

定价: 19.00 元